

Aus der Medizinischen Klinik III Großhadern der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. W. Hiddemann

Entwicklung von
Kapsidmutanten des Adenoassoziierten Virus 2
mit potentielltem Tropismus für KDR

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bernhard Kaess

aus
Traunstein

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Hallek
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. B. Mayer Prof. Dr. U. Koszinowski
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Hildegard Bühning
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	27.04.2006

Inhalt

1	Einleitung.....	4
1.1	<i>Solide Tumoren.....</i>	4
1.1.1	Übersicht.....	4
1.1.2	Klassische Therapiekonzepte.....	4
1.1.3	Antiangiogene Therapieansätze.....	5
1.2	<i>Angiogenese.....</i>	5
1.2.1	Übersicht.....	5
1.2.2	VEGF	6
1.2.3	VEGF-Rezeptoren.....	7
1.3	<i>Gentherapie</i>	9
1.3.1	Einführung	9
1.3.2	Nichtviraler Gentransfer	9
1.3.3	Virale Vektorsysteme	10
1.3.4	Das Adenoassoziierte Virus 2.....	11
1.4	<i>Inhalt der Arbeit</i>	15
1.4.1	Ziel der Arbeit.....	15
1.4.2	Die inserierten Peptide	15
2	Material und Methoden.....	17
2.1	<i>Abkürzungen.....</i>	17
2.2	<i>Material.....</i>	20
2.2.1	Chemikalien und Reagenzien	20
2.2.2	Verbrauchsmaterial	21
2.2.3	Puffer und Lösungen	21
2.2.4	Enzyme	22
2.2.5	Proteine und Antikörper	22
2.2.6	Primer und Oligonukleotide	22
2.2.7	DNA-Größenmarker.....	23
2.2.8	Zellen und Zelllinien	23
2.2.9	Bakterien.....	25
2.2.10	Plasmide	26

Inhalt

2.2.11	Geräte	28
2.3	<i>Methoden</i>	29
2.3.1	Design von Oligonukleotiden und Simulation von Klonierungen.....	29
2.3.2	Bakterienkultivierung	29
2.3.3	Transformation von E. coli-Bakterien.....	31
2.3.4	Präparation und Analyse von DNA	32
2.3.5	Modifikation von DNA	36
2.3.6	Sequenzierung.....	38
2.3.7	Isolierung von HUVEC	38
2.3.8	Kultivierung von Zellen und Zellzahlbestimmung	38
2.3.9	Virusproduktion, Aufreinigung und Lagerung	39
2.3.10	Präparation von DNA aus Zellen und Virusstock.....	42
2.3.11	Benzonase-Verdau der Viruspräparationen.....	42
2.3.12	Bestimmung genomischer Titer durch DotBlot.....	43
2.3.13	Bestimmung genomischer Titer durch Realtime-PCR des GFP-Gens	45
2.3.14	Realtime-PCR für das Viruskapsid-Gen	47
2.3.15	Bestimmung des Kapsid-Titers durch ELISA	48
2.3.16	Immunologischer Nachweis von KDR.....	49
2.3.17	Infektion von Zellen	50
2.3.18	Durchflusszytometrie	50
3	Ergebnisse	52
3.1	<i>Klonierung der Mutanten</i>	52
3.2	<i>Sequenzierung der Konstrukte</i>	53
3.3	<i>Produktion der wt-Konstrukte</i>	53
3.3.1	Genomischer Titer im DotBlot	53
3.3.2	Kapsid-Titer im ELISA	55
3.4	<i>Umklonierung in pRC</i>	56
3.5	<i>Produktion der pRC-Konstrukte</i>	58
3.5.1	Genomischer Titer im DotBlot	58
3.5.2	Genomischer Titer in der Realtime-PCR	59
3.5.3	Vergleich von DotBlot und Realtime-PCR	60

Inhalt

3.5.4	Genomischer Titer aller Phasen der Ultrazentrifugationsgradienten	60
3.6	<i>Etablierung einer quantitativen PCR im Cap-Gen</i>	63
3.7	<i>Analyse der KDR-Expression auf PAE und PAE-KDR</i>	64
3.8	<i>Charakterisierung der Mutanten</i>	64
3.8.1	Infektiosität der Mutanten auf HeLa	64
3.8.2	Infektiosität der Mutanten auf PAE und PAE-KDR	66
3.8.3	AAV2 wt auf PAE und PAE-KDR: FACS-Analyse.....	67
3.8.4	AAV wt auf PAE und PAE-KDR: genomische Messung.....	67
3.8.5	AAV wt und V1 auf HUVEC	69
3.8.6	AAV wt und V1 auf HFF	70
4	Diskussion	71
4.1	<i>Klonierung der Plasmide</i>	71
4.2	<i>Virusproduktion</i>	71
4.3	<i>Infektionsverhalten der Mutanten</i>	73
4.3.1	Transduktion von HeLa-Zellen.....	73
4.3.2	Transduktion von PAE und PAE-KDR-Zellen.....	73
4.3.3	Transduktion von HUVEC	75
4.3.4	Transduktion von HFF	76
4.4	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	76
5	Referenzen	78
6	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	85
6.1	<i>Abbildungen</i>	85
6.2	<i>Tabellen</i>	86
7	Lebenslauf	87
8	Danksagung	90

1 Einleitung

1.1 Solide Tumoren

1.1.1 Übersicht

Bösartige Neoplasien sind nach den kardiovaskulären Erkrankungen mit etwa 20% die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt 2004). Unter den bösartigen Neubildungen stellen die soliden Tumoren den größten Teil. Bei den Frauen dominiert das Mamma-Karzinom mit ca. 10% Lebenszeitinzidenz und einem Anteil an der Gesamtsterblichkeit von annähernd 4% (Statistisches Bundesamt 2004), bei den Männern das Bronchialkarzinom mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 60/100000 (Herold 2005 a), an zweiter Stelle folgt geschlechtsunabhängig das Kolonkarzinom mit über 40/100000 Neuerkrankungen / Jahr (Herold 2005 b). Da die Prognose fast aller Neoplasien stark von ihrem Stadium bei Diagnosestellung abhängt, wurden Früherkennungsprogramme eingerichtet, so für das Mammakarzinom, das Zervixkarzinom und das kolorektale Karzinom. Dennoch hat der „Krebs“ seinen Schrecken noch nicht verloren und die Prognose der meisten Formen ist immer noch relativ schlecht.

1.1.2 Klassische Therapiekonzepte

Der wichtigste therapeutische Ansatz bei fast allen soliden Tumoren ist die Chirurgie, das heißt die möglichst vollständige Entfernung des entarteten Gewebes. Dies ist im Frühstadium meist relativ gut möglich. In fortgeschrittenen Stadien und vor allem bei Metastasierung gerät die Chirurgie jedoch an ihre Grenzen, hier beruhen die klassischen Therapieverfahren zum einen auf der systemischen Anwendung zytostatischer und zytotoxischer Substanzen, zum anderen auf der möglichst lokalen Zerstörung von Gewebe mit verschiedenen pharmakologischen und physikalischen Ansätzen. Beide Verfahren haben allerdings gravierende Nebenwirkungen. Die systemische Applikation von Zytostatika hemmt alle schnell proliferierenden Gewebe, so auch Knochenmark und Schleimhäute. Blutbildveränderungen wie Anämie und Agranulozytose und gastrointestinale Symptome gehören deswegen zu den üblichen Nebenwirkungen der sogenannten Chemotherapie. Aber auch die möglichst lokale Zerstörung, beispielsweise durch Bestrahlung, zeigt oft gravierende Nebenwirkungen, vor allem durch Schädigung des benachbarten gesunden Gewebes.

Ein neuerer Therapieansatz hat die metabolische Versorgung der Tumoren als Ziel. So wird z.B. bei Lebertumoren versucht, endoskopisch die versorgenden Gefäße zu koagulieren (Kokudo et al. 2004). Auch diese Technik ist allerdings in ihrer Anwendung beschränkt, insbesondere auf relativ eng lokalisierte Neoplasien.

1.1.3 Antiangiogene Therapieansätze

Ein potentiell breiteres Einsatzspektrum haben Inhibitoren der Tumorangiogenese. Sie versuchen, die durch Neoplasien induzierte Gefäßneubildung zu unterdrücken. Mittlerweile sind erste Erfolge zu verzeichnen, so ergaben Versuche mit Endostatin und Angiostatin, zwei körpereigenen Angiogeneseinhibitoren, in Mäusen gute Ergebnisse (Blezinger et al. 1999; Lalani et al. 2004). Erste Ergebnisse aus klinischen Studien sind allerdings weniger vielversprechend (Thomas et al. 2003b). Neben diesen physiologischen Wachstumsinhibitoren werden auch Antikörper und niedermolekulare Inhibitoren, sogenannte „small molecule inhibitors“, bereits klinisch getestet (Verheul et al. 2003).

1.2 Angiogenese

1.2.1 Übersicht

Die Neubildung von Gefäßen ist ein zentraler Prozess im menschlichen Körper. Die sogenannte Angiogenese ist ein essentieller physiologischer Prozess unter anderem in der Embryonalentwicklung, der Wundheilung und dem weiblichen Zyklusgeschehen. Aber auch als pathologischer Vorgang spielt sie eine wichtige Rolle, so vor allem bei Tumoren. Jede solide Neoplasie ab wenigen Kubikmillimetern Volumen induziert Gefäßwachstum, wie die Gruppe um Judah Folkman schon 1972 postulierte (Gimbrone et al. 1972). Ferner sind auch bei Leukämien, bei diabetischer Retinopathie und bei rheumatoider Arthritis angiogene Prozesse involviert (Koch 1998; Folkman 2001). Die potentiellen Einsatzgebiete angiogener wie antiangiogener Substanzen sind also weit gefächert, sie reichen von der Revaskularisierung nach einem Herzinfarkt bis zur bereits erwähnten Tumorthherapie. Deswegen ist die Charakterisierung von tumorinduzierten Gefäßen und der Prozess der Angiogenese Gegenstand intensiver Forschung der letzten Jahre.

1.2.2 VEGF

Zentraler Mediator der Angiogenese ist „vascular endothelial growth factor“ (VEGF). Mit VEGF wird im engeren Sinne VEGF-A bezeichnet, der erstbeschriebene und wohl auch wichtigste Vertreter einer ganzen Familie von Wachstumsfaktoren. Mittlerweile sind einige weitere Mitglieder der Familie identifiziert worden, so VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und PlGF (placental growth factor), wobei VEGF-E ein von Parapox-Viren exprimiertes VEGF-Analogon ist (Lytle et al. 1994). Im folgenden ist mit VEGF stets VEGF-A gemeint.

Durch alternatives Spleißen werden verschiedene Isoformen von VEGF gebildet. Beschrieben sind Varianten mit 121, 145, 165, 184, 189 und 206 Aminosäuren Länge, von denen VEGF₁₆₅ die vorherrschende Form ist. Alle Isoformen beinhalten dieselben 115 N-terminalen Reste (Muller et al. 1997a), die für die Rezeptorbindung verantwortlich sind. Ferner binden alle Varianten mit Ausnahme von VEGF₁₂₁ Heparin (Ferrara 2000), zunehmend mit ihrer Länge. VEGF gehört damit zur Gruppe der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren wie z.B. auch FGF (fibroblast growth factor) und PDGF (platelet-derived growth factor) (Liekens et al. 2001).

Die VEGF-Expression wird stimuliert durch zahlreiche Botenstoffe, unter anderem PDGF, EGF (epidermal growth factor), TNF- α (tissue necrosis factor α), TNF- β , IL-1 β (Interleukin 1 β) (Liekens et al. 2001) sowie durch Hypoxie (Waltenberger et al. 1996). VEGF scheint also zentraler Sekundärmediator für zahlreiche indirekt wirkende angiogene Faktoren zu sein.

Eine essentielle Rolle spielt VEGF in der Embryonalentwicklung, schon heterozygote Knockout-Mäuse sterben in utero (Carmeliet et al. 1996; Ferrara et al. 1996). Aber auch im adulten Körper werden physiologische wie pathologische Angiogeneseprozesse durch VEGF vermittelt. Bei der Tumorangiogenese spielt VEGF eine zentrale Rolle, wie seit längerem bekannt ist (Plate et al. 1992; Plate et al. 1993), und so kann Tumorwachstum durch Anti-VEGF-Antikörper unterdrückt werden (Kim et al. 1993). Auch die proliferative diabetische Retinopathie ist VEGF-vermittelt und kann beispielsweise durch Ausschalten von VEGF mittels siRNA (small interfering RNA) positiv beeinflusst werden, wie für Mäuse gezeigt wurde (Reich et al. 2003).

Die Röntgenkristallstruktur von VEGF ist bekannt (Muller et al. 1997a; Muller et al. 1997b). VEGF bildet Dimere durch antiparallele Seit-an-Seit-Lagerung. Mittels Alanin-Scanning-Mutagenese und Erkenntnisse aus der Kristallstruktur konnten die Bindungsdomänen für VEGFR-1 und KDR (siehe Abschnitt 1.2.3) eingegrenzt werden. So wurden insbesondere die Aminosäuren Phe17, Ile46, Asp63, Glu64, Gln79, Arg82, Ile83, Lys84 und His86 als wichtig für die KDR-Bindung beschrieben, während die basischen Reste Asp63, Glu64 und Glu67 für die VEGFR-1-Affinität verantwortlich zu sein scheinen (Keyt et al. 1996; Muller et al. 1997b).

1.2.3 VEGF-Rezeptoren

Mittlerweile sind verschiedene Rezeptoren für VEGF bekannt. Als erster wurde 1992 VEGFR-1 (synonym „fms-like tyrosine kinase 1“, flt-1) beschrieben (de Vries et al. 1992), ein Tyrosinkinaserzeptor mit 7 Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Er wird vor allem auf Endothelzellen exprimiert und bindet VEGF mit hoher Affinität (Waltenberger et al. 1994). Die Funktion von VEGFR-1 ist nicht endgültig geklärt. VEGFR-1 ist essentiell für die Embryonalentwicklung von Mäusen (Fong et al. 1999). Die selektive Stimulation von VEGFR-1 führt nicht zur Endothelproliferation (Gille et al. 2001), während die Verdrängung von VEGF an VEGFR-1 durch PlGF die Angiogenese erhöht (Park et al. 1994). Die Tyrosinkinaseaktivität von VEGFR-1 ist wesentlich geringer als die von VEGFR-2 / KDR (Waltenberger et al. 1994), und sogar der Knockout der Tyrosinkinasedomäne führt bei Mäusen nicht zu einer gestörten Embryonalentwicklung (Hiratsuka et al. 1998). Die Hauptfunktion von Flt-1 scheint daher die Regulation von Angiogenese durch Sequestrierung von VEGF zu sein. Neuerdings wird allerdings berichtet, dass die Stimulation von VEGFR-1 zur Ausschüttung parakriner Faktoren führt, was in der Hämatopoese und in der Leber eine Rolle zu spielen scheint (Ferrara et al. 2003).

Der Schlüsselrezeptor bei Angiogenesevorgängen im menschlichen Körper ist der „vascular endothelial growth factor receptor 2“ VEGFR-2 (synonym: „kinase insert domain containing receptor“ **KDR**, „fetal liver kinase 1“ flk-1). Es handelt sich wie bei VEGFR-1 um einen Tyrosinkinaserzeptor mit 7 Immunglobulin-ähnlichen Domänen. KDR ist ein 1356 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 205 kDa, das auf der Zelloberfläche als Homo-Dimer vorliegt, aber auch mit anderen Rezeptoren, z.B. αvβ3 Integrin als Heterodimer präsentiert werden kann (Soldi et al. 1999). KDR bindet VEGF mit vielfach

geringerer Affinität als VEGFR-1, hat aber eine wesentlich höhere Tyrosinkinaseaktivität (Waltenberger et al. 1994). Er ist essentiell für die Embryonalentwicklung, KDR-Knockout-Mäuse sterben um den neunten Tag in utero (Shalaby et al. 1995; Shalaby et al. 1997). Aktivierung von KDR führt zu Proliferation von Endothelzellen, zu Angiogenese und erhöhter Gefäßpermeabilität (Gille et al. 2001), seine Blockade durch Antikörper verhindert die VEGF-induzierte Mitogenese in Endothelzellen (Zhu et al. 1999). Die Expression von KDR wird unter anderem stimuliert durch VEGF (Kremer et al. 1997), daher ist der Rezeptor auf angiogenem Endothel stark hochreguliert, so auch in Tumoren (Plate et al. 1993). Allerdings ist KDR nicht ausschließlich auf Endothel exprimiert, wie ursprünglich angenommen. Er wurde insbesondere auch auf hämatopoietischen Stammzellen gefunden (Ziegler et al. 1999). Trotzdem scheint KDR ein vielversprechendes, weil relativ selektives Ziel zur Therapie solider Neoplasien. Erste Erfolge sind bereits publiziert. So reduziert die Blockade von KDR durch Antikörper - exogen zugeführt oder durch Immunisierung gebildet - Tumorwachstum und Metastasierung in Mäusen (Kim et al. 1993; Li et al. 2002), erste klinische Studien laufen (Posey et al. 2003).

Mit einem Fusionsprotein bestehend aus VEGF₁₂₁ und einer rekombinanten Form des Zytotoxins Gelonin konnte Tumorendothel in Mäusen effektiv getargetet und zerstört werden (Veenendaal et al. 2002). Auch ein Shigatoxin-VEGF₁₂₁-Fusionsprotein zeigte sich selektiv toxisch für KDR-positive Endothelzellen (Backer et al. 2001). Des weiteren ist KDR als Ziel für gentherapeutische Ansätze geeignet. So konnte gezeigt werden, dass Vektoren basierend auf ALV (avian leukosis virus) in Anwesenheit eines Fusionsproteins aus VEGF₁₁₀ und der extrazellulären Domäne von TV-A (dem natürlichen Rezeptor von ALV) PAE-KDR-Zellen KDR-vermittelt infizieren (Snitkovsky et al. 2001). Und auch auf transkriptioneller Ebene lässt sich ein Targeting erreichen; so führt die Verwendung des KDR-Promotors zur selektiven Transgen-Expression in Tumorendothel (Heidenreich et al. 2000). Alles in allem ist KDR ein vielversprechendes Ziel neuer Therapiestrategien gegen solide Tumoren.

Ein weiterer Rezeptor für VEGF ist Neuropilin-1 (NP-1), der selektiv VEGF₁₆₅ bindet. Er scheint die mitogene Aktivität von KDR zu erhöhen (Soker et al. 1998).

VEGFR-3 (synonym flt-4) hingegen besitzt keine Affinität zu VEGF, allerdings zu VEGF-C und VEGF-D. VEGFR-3 scheint im Gegensatz zu KDR vor allem in der Lymphangiogenese eine bedeutende Rolle zu spielen (Kukk et al. 1996).

1.3 Gentherapie

1.3.1 Einführung

Der Pschyrembel (260. Auflage, de Gruyter Verlag) definiert Gentherapie als „*experimentelle Therapieform zur Ausschaltung genbedingter Fehlfunktion bzw. Wiederherstellung einer normalen Genfunktion bei Erkrankungen, die durch Elimination oder Bereitstellung eines Proteins zu beeinflussen sind und für die keine ausreichend effektive andere Behandlungsmethode vorhanden ist.*“

Mit der Gentherapie wird also versucht, gezielt Erbmateriale in Körperzellen zu modifizieren. Dies versucht sie durch Einbringen von zusätzlicher Erbsubstanz (DNA oder RNA) zu erreichen, die dazu führt, dass entweder intakte Gene bzw. Genfragmente zur Verfügung gestellt oder pathologisch exprimierte Gene ausgeschaltet werden.

Um DNA in humane Zellen einzuschleusen, stehen verschiedene Verfahren zu Verfügung.

1.3.2 Nichtviraler Gentransfer

Zu den nichtviralen Gentransfertechnologien gehören die Applikation nackter DNA (also ohne Vektor), die Elektroporation, die sogenannte „Gene Gun“ und der Transfer von Nukleinsäure in verschiedenen Liposomen- und kationischen Polymer-Komplexen.

Entgegen früherer Annahmen wird auch ungeschützte, „nackte“ DNA von Körperzellen aufgenommen, jedoch mit sehr geringer Effizienz. So konnte Genexpression nach direkter DNA-Injektion in Skelettmuskelzellen, Leber, Schilddrüse, Herzmuskel, Gehirn und Tumoren nachgewiesen werden (Wolff et al. 1990; Vile et al. 1993; Hickman et al. 1994; Sikes et al. 1994; Ardehali et al. 1995; Schwartz et al. 1996). Eine einfache systemische Applikation „nackter“ DNA ist hingegen schwierig, da die Nukleinsäure mit einer Halbwertszeit von etwa 5 min degradiert wird (Kawabata et al. 1995). Durch verschiedene Methoden wie schnelle Injektion großer Volumina, Hemmung des venösen Abflusses oder auch Änderung des Puffergemisches lässt sich die Transduktionseffizienz steigern und sogar Genexpression nach systemischer Applikation nachweisen (Budker et al. 1996; Zhang et al. 1997; Zhang et al. 1999; Hartikka et al. 2000). Trotz alledem ist die Applikation nackter DNA relativ ineffizient und ungezielt.

Auch mit physikalischen Methoden wie Elektroporation, Einsatz von Magnetfeldern oder ballistischem Verfahren lässt sich die Genexpression signifikant erhöhen, einen guten Überblick gibt hier beispielsweise das kürzlich erschienene Review von D. J. Wells (Wells 2004).

Auf Liposomen- und kationische Polymerkomplexverfahren soll hier ebenfalls nicht näher eingegangen werden, es sei auf die entsprechende Literatur verwiesen (Schatzlein 2001; Merdan et al. 2002).

1.3.3 Virale Vektorsysteme

1.3.3.1 Überblick

Viren stehen als Vektoren für die Gentherapie seit Jahren im Zentrum der Forschung. Sie sind in der Regel sehr effizient für den Gentransfer in somatische Zellen, da ihr natürlicher Vermehrungszyklus genau diesen beinhaltet und evolutionär optimiert wurde. Für die Gentherapie werden zur Zeit eine Reihe von Viren entwickelt, die im wesentlichen aus 5 Hauptklassen abgeleitet sind. Zu ihnen zählen die umhüllten Onkoretro-, Lenti- und Herpes-simplex-Viren sowie die nicht umhüllten Adeno- und Adenoassoziierten Viren (Thomas et al. 2003a).

Virus	Max. Kapazität	Tropismus	Genpersistenz	Inflammatorisches Potential
Retroviren	8 kb	sich teilende Zellen	integriert	gering
Lentiviren	8 kb	breit	integriert	gering
HSV-1	150 kb	v.a. Nervenzellen	episomal	hoch
AAV	< 5 kb	breit	z.T. integriert	gering
Adenoviren	30 kb	breit	episomal	hoch

Tabelle 1: Übersicht über verschiedene virale Genvektoren (angelehnt an Thomas et al. 2003)

Die einzelnen Virusklassen unterscheiden sich stark, unter anderem bezüglich Tropismus, Vermehrungsmodus, Genomintegration, Kodierungskapazität und Immunogenität, was für verschiedene Anwendungen verschiedene Vektoren vorteilhaft erscheinen lässt. So infizieren

Retroviren nur sich teilende Zellen, und HSV-1 hat einen starken Tropismus für Nervenzellen, während die übrigen Vektorklassen ein eher breites Wirtspektrum aufweisen. Retro-, Lenti-, Adeno- und Adenoassoziierte Viren integrieren zumindest teilweise in das Wirtsgenom und sind deswegen potentiell onkogen. So wurden nach Gabe von Retroviren, die den gamma-c-Kettenrezeptor, das defekte Gen der schweren kombinierten Immundefizienz X1, kodieren, nicht nur die erste definitive Heilung einer Erkrankung durch Gentherapie berichtet, sondern leider auch 2 Fälle von therapieinduzierten lymphoproliferativen Erkrankungen (Cavazzana-Calvo et al. 2000; Hacein-Bey-Abina et al. 2003). Ein weiteres Problem von großer klinischer Relevanz ist die hohe Immunogenität von HSV-1 und Adenoviren, so starb ein Patient nach hochdosierter Gabe eines adenoviralen Vektorkonstrukts im Jahre 1999 an Multiorganversagen bei disseminierter intravaskulärer Gerinnung (Lehrman 1999).

Im folgenden sei nun genauer auf das Adenoassoziierte Virus 2 eingegangen, das in dieser Arbeit verwendete Vektorsystem.

1.3.4 Das Adenoassoziierte Virus 2

Das Adenoassoziierte Virus (AAV) wurde 1965 von Robert Atchison als Kontamination adenoviraler Präparationen im Elektronenmikroskop entdeckt (Atchison et al. 1965). Mittlerweile sind 11 Serotypen von AAV bekannt, von denen Typ 2 (AAV2) der am besten charakterisierte ist und in der Gentherapie am meisten verwendet wird.

1.3.4.1 Biologie von Wildtyp-AAV2

AAV2 ist ein nicht umhülltes Virus; seine ungefähr 4,7 kb große, einzelsträngige DNA ist von einem ikosaedrischen Kapsid mit ca. 25 nm Durchmesser umschlossen. Erst vor relativ kurzer Zeit gelang die Röntgenkristallstrukturanalyse des Virions (Xie et al. 2002). Neben denen für die Verpackung in das virale Kapsid notwendigen Sequenzen („inverted terminal repeats“ ITRs) kodiert die virale DNA für die rep-Gene, deren Genprodukte regulatorisch aktiv sind, und für die cap-Strukturgene. Durch verschiedene Promotoren und alternatives Spleissen werden vier verschiedene Varianten von Rep synthetisiert. Die Rep-Proteine sind an der sequenzspezifischen Integration, der Replikations- und Transkriptionskontrolle sowie an der Verpackung der einzelsträngigen DNA in das virale Kapsid beteiligt. Die Expression von cap

Teil 1 – Einleitung

führt zur Synthese der drei Strukturproteine VP1, VP2 und VP3, die in einem Verhältnis von 1:1:8 das virale Kapsid bilden (Kronenberg et al. 2001).

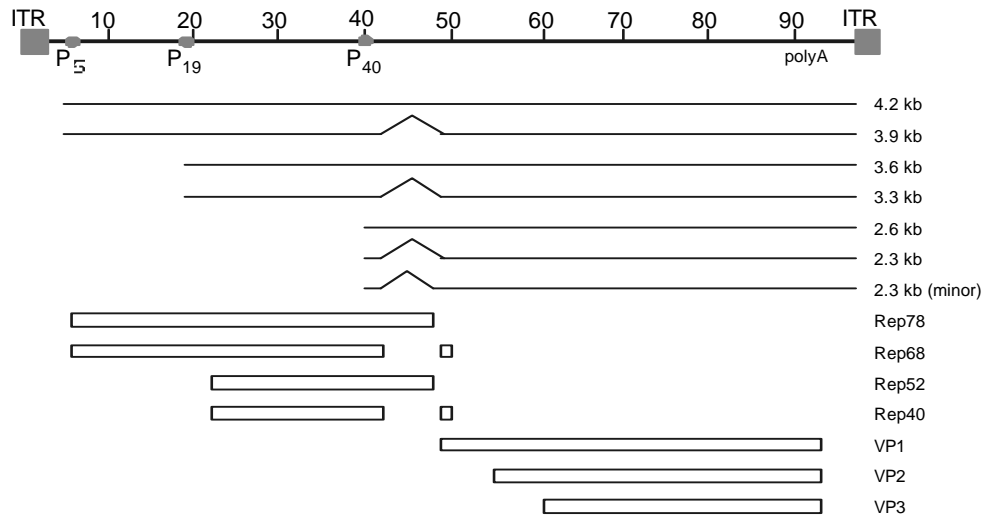


Abbildung 1: Genomstruktur und Genexpression von AAV-2 (dünne durchgezogene Linie: mRNA; Winkel: Introns; Kästchen: translatierter Bereich; Abb. freundlicherweise überlassen von Dr. H. Büning)

In der schematischen Darstellung des AAV-Genoms (Abbildung 1) sind die zwei invertierten, terminalen Wiederholungen (ITR), die drei viralen Promotoren (p5, p19 und p40) und das gemeinsame Polyadenylierungssignal eingezeichnet. Der 5'-gelegene offene Leserahmen („open reading frame“ ORF) kodiert für die Rep-Proteine. Die großen Rep-Proteine (Rep78 und seine Spleißvariante Rep68) werden vom p5-Promotor, die kleinen Rep-Proteine dagegen (Rep52 und seine Spleißvariante Rep40) vom p19-Promotor aus kontrolliert. Der 3'-gelegene ORF kodiert für die Kapsid-Proteine VP1, VP2 und VP3, die unter der Kontrolle des p40-Promotors stehen. Die viralen ITRs liegen im einzelsträngigen AAV2-Genom teilweise gepaart vor.

Da rep und cap für die Virusproduktion in trans zur Verfügung gestellt werden können, ist es möglich, die zwischen den ITRs liegende Geninformation komplett durch ein Transgen zu ersetzen. Das rekombinante Virus trägt somit keine AAV2-eigenen Gene mehr, was unter Sicherheitsaspekten von großem Vorteil ist.

Die Aufnahme von Wildtyp-AAV2 in die Zelle erfordert die Interaktion zwischen Proteinen des Viruskapsids und dem primären AAV2-Rezeptor Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) auf

der Zelloberfläche (Summerford et al. 1998). Neben HSPG scheinen Korezeptoren an der Virus-Zell-Interaktion beteiligt zu sein, wie z.B. der Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR-1), der Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR) und das Integrin $\alpha_v\beta_5$ (Mizukami et al. 1996; Qing et al. 1999; Summerford et al. 1999; Kashiwakura et al. 2005). Im Anschluss an die Zellbindung erfolgt - überwiegend über Clathrin-vermittelte Endozytose - die Internalisierung (Bartlett et al. 2000; Douar et al. 2001). Die AAV2 enthaltenden Endosomen wandern dann wahrscheinlich entlang von Mikrotubulistrukturen in Richtung Kern (Seisenberger et al. 2001). Die Ansäuerung des Kompartiments beim Übergang vom frühen zum späten Endosom scheint den AAV-Partikeln den Übertritt ins Zytosol zu ermöglichen (Bartlett et al. 2000; Douar et al. 2001), wo die AAV2-Partikel perinukleär akkumulieren (Bartlett et al. 2000). Ob die virale DNA hauptsächlich bereits dort oder erst nach Übertritt in den Kern aus dem Kapsid freigesetzt wird, ist kontrovers (Sanlioglu et al. 2000; Xiao et al. 2002). Im Kern schließlich erfolgt aus dem einzelsträngigen viralen Erbmaterial (ssDNA) die Bildung von doppelsträngiger DNA (dsDNA). Dies kann durch de-Novo-Synthese des komplementären Strangs oder durch Hybridisierung von viraler Plus- und Minusstrang ssDNA erfolgen (Ferrari et al. 1996; Fisher et al. 1996; Nakai et al. 2000).

1.3.4.2 AAV als Vektor für die Gentherapie

AAV2 ist aus mehreren Gründen sehr geeignet für die Gentherapie:

- Das Wildtyp-AAV2 besitzt ein breites zelluläres Wirtsspektrum, fast jede Zellart ist in vitro infizierbar.
- Das Wildtyp-AAV2 ist das einzige eukaryotrope Virus, das sein Genmaterial an einem genau bekannten, konstanten Lokus integrieren kann, nämlich auf Chromosom 19 im menschlichen Genom (Kotin et al. 1990). Dadurch ist das Risiko für eine Insertionsmutagenese durch Beeinflussung anderer Genloci verringert.
- AAV2-Vektoren zeigen eine lange und stabile Transgenexpression in vivo (Herzog et al. 1999).
- AAV2 ist alleine nicht vermehrungsfähig, es handelt sich um ein sogenanntes Dependovirus. AAV2 benötigt für seine Replikation bestimmte Proteinfunktionen eines Helfervirus, was die therapeutische Anwendung zusätzlich sicher macht.

- AAV2 ist – im Gegensatz zu allen anderen derzeit in präklinischer Entwicklung befindlichen viralen Vektoren - nach heutigem Kenntnisstand apathogen für den Menschen.
- AAV2 zeigt eine im Vergleich zu vielen anderen Viren nur geringe und vorwiegend humorale Immunogenität (Brockstedt et al. 1999).
- Weitere generelle Vorteile sind die Infizierbarkeit ruhender Zellen sowie die im Vergleich zu anderen viralen Vektoren relativ effiziente Vektorproduktion, die ca. 10^{10} transduzierende Einheiten pro Milliliter erreicht.

1.3.4.3 Modifizierung des Tropismus von AAV

Bereits lange vor der Auflösung der Kristallstruktur von AAV2 wurden durch Vergleiche mit dem engverwandten CPV (canine parvovirus) Stellen im AAV2-Kapsid identifiziert, die an der Oberfläche des Virions exponiert sind und sich zur Insertion von Ligandenpeptiden eignen. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass sich der Tropismus von AAV durch Insertion des Integrinliganden L14 nach der Aminosäure 587 des Kapsidproteins VP1 modifizieren lässt (Girod et al. 1999). Mittlerweile gelangen weitere Insertionen in das AAV2-Kapsid. So konnte über den Einbau eines durch Phage-Display auf primären menschlichen Nabelschnurendothelzellen (human umbilical vein endothelial cells HUVEC) isolierten Heptapeptids der Tropismus von AAV2 für eben diese Zellen signifikant verbessert werden (Nicklin et al. 2001). In einer weiteren Arbeit konnte nach Insertion von Z34C, einer Bindungsdomäne für den F_c-Teil von Antikörpern, ein antikörpervermitteltes Retargeting auf hämatopoetische Zelllinien gezeigt werden (Ried et al. 2002). Publiziert wurde ferner ein erfolgreiches Tumortargeting in vivo durch Insertion von NGR-Motiven und RGD-Motiven (Grifman et al. 2001; Shi et al. 2003). Eine sehr vielversprechende Modifikation gelang mit der Entwicklung eines AAV-Displays, das im Bereich der Position 587 eine Zufallssequenz von sieben Aminosäuren Länge enthält und damit theoretisch ungefähr $20^7 \approx 10^8$ verschiedene Mutanten umfasst. Aus diesem Pool konnten nun über einen evolutionären Algorithmus Mutanten mit optimierter Infektiosität für verschiedene Zelllinien isoliert werden (Müller et al. 2003; Perabo et al. 2003).

1.4 Inhalt der Arbeit

1.4.1 Ziel der Arbeit

Die Arbeit beinhaltet die Insertion drei verschiedener, potentiell KDR-bindender Peptide in das AAV-Kapsid und die anschließende Charakterisierung der Mutanten.

Es soll so untersucht werden, ob die Mutanten einen Tropismus für angiogenes Epithel erwarten lassen und daher als Vektoren für antiangiogene gentherapeutische Ansätze geeignet sind.

1.4.2 Die inserierten Peptide

1.4.2.1 Das Peptid V1

R. Binetruy-Tournaire et al. berichteten die Identifikation eines Peptids, das mit hoher Affinität an KDR bindet und die Bindung von VEGF komplett blockiert (Binetruy-Tournaire et al. 2000). Die Autoren führten dazu Selektionen auf zellulär exprimiertem KDR und auf immobilisierten Anti-VEGF-Antikörpern mit einem Gemisch von Bakteriophagen durch, das zufällige Heptapeptide exprimiert. Nach 4 Selektionszyklen auf den gebundenen Antikörpern konnten die Autoren sieben Sequenzen isolieren, unter denen die Sequenz ATWLPPR die höchste Affinität zu KDR zeigte. Das von den Autoren mit „V1“ bezeichnete Peptid hemmt die Bindung von VEGF an KDR mit einer halbmaximalen Wirkung bei etwa 80 μM .

1.4.2.2 Das Peptid K237

Das Peptid K237 wurde in ähnlicher Weise wie V1 isoliert. Hetian et al. führten vier Selektionsrunden mit einem Phagen-Pool, der Dodekapeptide exprimiert, auf immobilisierten KDR-Protein durch. Die höchste Affinität zeigte das Peptid K237 mit der Sequenz MHNHHNHPRPSS. Auch K237 blockiert die Bindung von VEGF an KDR, mit einer geschätzten halbmaximalen Wirkung bei 150 μM (Hetian et al. 2002).

1.4.2.3 Das Peptid VBR

Das Peptid, das in dieser Arbeit als VBR (VEGF binding region) bezeichnet wird, enthält die Aminosäuren 75 bis 97 von VEGF mit der Sequenz NITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFL. Es beinhaltet somit die Reste Gln79, Arg82, Ile79, Lys84 und His86, die als kritische Positionen für die Bindung von VEGF an KDR beschrieben worden sind (Key et al. 1996; Muller et al. 1997a).

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenosin
A. dest.	entionisiertes Wasser
Abb.	Abbildung
Ac	Azetat
Ad	Adenovirus
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CMV	Cytomegalie-Virus
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1]decan}-4-yl) phenylphosphat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxribonuklease
dNTP	Desoxnukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
EDTA	Ethylamindiamintetraessigsäure

Teil 2 – Material und Methoden

ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FCS	Fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2- Ethansulfonsäure
IE	Internationale Einheiten
ITR	invertierte terminale Wiederholungen
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
µl	Mikroliter
mA	Milli-Ampère
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin

Teil 2 – Material und Methoden

Pho	Phosphatgruppe
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sKDR	soluble recombinant kinase domain receptor
t	Zeit
T	Temperatur
Tab	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris/ EDTA
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
Vol	Volumen
wt	Wildtyp

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
α -Chymotrypsin	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Aqua bidest.	Millipore, Billerica
Biotin konjugiertes Streptavidin	Dianova, Hamburg
Bovines Serumalbumin	AppliChem, Darmstadt
CSPD	Boehringer Mannheim
Cy5 Monofunctional Dye	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Boehringer Mannheim
<i>EndoFree Plasmid Maxi / Mega Kit</i>	Qiagen, Hilden
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formamid	Fluka ChemieAG, Buchs
Fötales Kälberserum	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Geneticin	Life Technologies Inc., Gaithersburg
Heparin	B. Braun Melsungen AG
HEPES	Roth, Karlsruhe
Iodixanol	Progen, Heidelberg
Maleinsäure	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Riedel-de Haën, Seelze
PBS	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Proteinase K	Merck, Darmstadt
TMB	Sigma, Deisenhofen

Tris	Merck, Darmstadt
<i>TritonX-100</i>	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
<i>Tween20</i>	Merck, Darmstadt

2.2.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
<i>Biomax Light</i> Film	Kodak, Stuttgart
Dialysemembranen	Millipore, Billerica
Elektroporationsküvetten	Biorad, München
Kanülen	Peske, Aindling
<i>Maxisorp</i> 96-Well-Platte	Nunc, Wiesbaden
Nylonmembran für DotBlot	Roche, Mannheim
Parafilm	American National CanTM
<i>Quickseal</i> -Tubes	Beckmann, Palo Alto
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen
Zentrifugenröhrchen	Falcon

2.2.3 Puffer und Lösungen

Siehe bei den jeweiligen Methoden.

2.2.4 Enzyme

Produkt	Bezugsquelle
calve intestine alkaline phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Schwalbach
Benzonase	Merck, Darmstadt
Klenow-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Trypsin-EDTA	Invitrogen Corporation, Karlsruhe

2.2.5 Proteine und Antikörper

Produkt	Quelle	Bezugsquelle
A20 (AAV2-Kapsidantikörper) Hybridomüberstand	Maus	DKFZ Heidelberg, Prof. Kleinschmidt
Biotin-SP-konjugierter anti Maus Antikörper	Kaninchen	Dianova, Hamburg
AP-konjugierter Anti-Dig-Antikörper		Boehringer Mannheim
Anti-KDR-Antikörper mit E-Tag	E. coli	Reliatech, Mannheim
Anti-E-Tag-Antikörper	Maus	Amersham Pharmacia
Anti-mFc-Antikörper mit FITC-Markierung	Schaf	Sigma, Deisenhofen
rekombinanter löslicher humaner KDR	Insektenzellen	Reliatech, Braunschweig

2.2.6 Primer und Oligonukleotide

Primer und Oligonukleotide wurden bestellt bei Metabion (Martinsried).

Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:

Name	Sequenz
OBK1	5'- Pho - GGC CGC TGC AAC TTG GCT ACC ACC CCG GGC CG – 3'
OBK2	5'- Pho - CGC GCG GCC CGG GGT GGT AGC CAA GTT GCA GC – 3'
OBK3	5'- Pho - GGC CGC TCA CAC GAT GTA CTA CCA TCA CTA TCA GCA TCA TCT GGC GG – 3'
OBK4	5'- Pho - CGC GCC GCC AGA TGA TGC TGA TAG TGA TGG TAG TAC ATC GTG TGA GC – 3'
OBK5	5'- Pho - GGC CGC GAA TAT TAC TAT GCA AAT CAT GCG CAT CAA GCC TCA TCA AGG TCA GCA CAT AGG CGA GAT GTC GTT CCT CGC GG – 3'
OBK6	5'- Pho - CGC GCC GCG AGG AAC GAC ATC TCG CCT ATG TGC TGA CCT TGA TGA GGC TTG ATG CGC ATG ATT TGC ATA GTA ATA TTC GC – 3'

Folgende Primer wurden eingesetzt:

Primer	Sequenz
4066-back	5' – ATGTCCGTCCGTGTGTGG
3021-forward	5' - GGTACGACGACGATTGCC-3'
EGFP-1 forward	5' – GCTACCCCGACCACATGAAG
EGFP-1 reverse	5'– GTCCATGCCGAGAGTGATCC

2.2.7 DNA-Größenmarker

Es wurde der *100bp Ladder Mix* von MBI Fermentas verwendet.

2.2.8 Zellen und Zelllinien

Teil 2 – Material und Methoden

Folgende Zellen und Zelllinien wurden verwendet:

Bezeichnung	Beschreibung	Kulturmedium
HELA	Humane epitheloide Zervixkarzinomzelllinie	DMEM 10% FCS 1% Pen / Strep
HEK 293	Humane embryonale Nierenzelllinie, durch die adenovirale Gene E1A und E1B immortalisiert.	DMEM 10% FCS 1% Pen / Strep
HFF	Humane Vorhaut-Fibroblasten, käuflich erworben bei Promocell	DMEM 10% FCS 1% Pen / Strep
HUVEC	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen, präpariert aus Nabelschnüren (freundlichsten überlassen von der Abteilung für Geburtshilfe, Klinikum Großhadern)	ECGM 2% FCS 1% Pen / Strep
PAE	Immortalisierte Schweineaortenendothelzellen, freudlichst überlassen von Dr. Waltenberger, Ulm.	Ham's F12 1% Pen / Strep 0,4 mg/ml Geneticin
PAE-KDR	Immortalisierte Schweineaortenendothelzellen, die KDR stabil überexprimieren (Waltenberger et al. 1994). Erzeugt und freudlichst überlassen von Dr. Waltenberger, Ulm.	Ham's F12 1% Pen / Strep 0,4 mg/ml Geneticin

Verwendete Zellkulturmedien:

Medium	Bezugsquelle
DMEM mit Glutamax	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Ham's F12	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
ECGM	Promocell, Heidelberg

2.2.9 Bakterien

Stamm	Genotyp	Referenz
E. coli DH10B	F ⁻ , mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, recA1, endA1, araD139, Δ (ara, leu)7697, galU, galK, λ -rpsL, nupG	Invitrogen Corporation, Karlsruhe

2.2.10 Plasmide

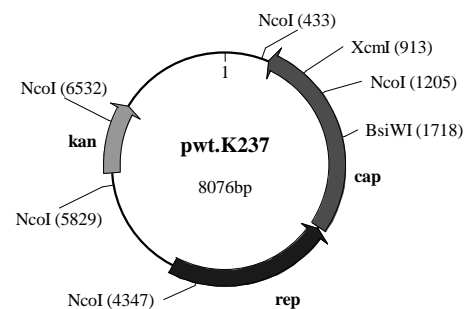
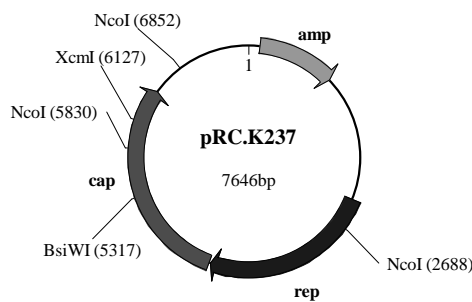
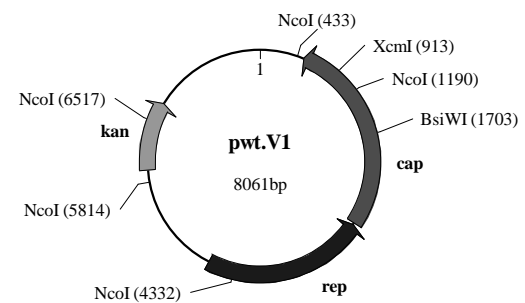
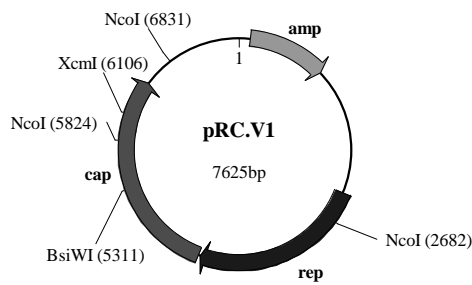
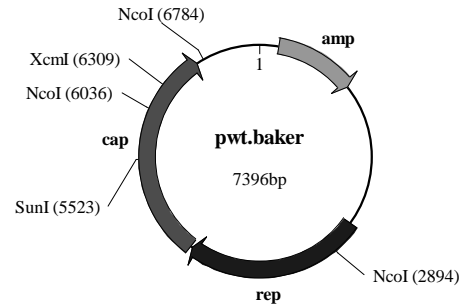
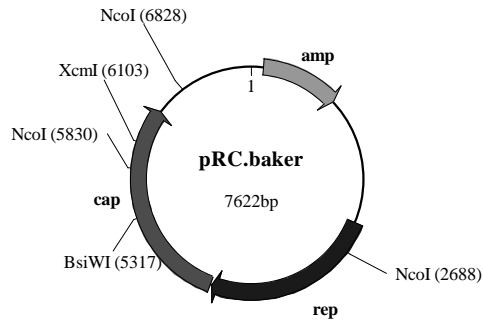
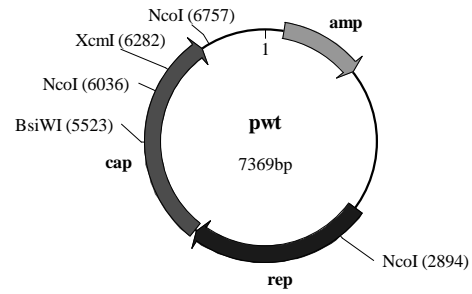
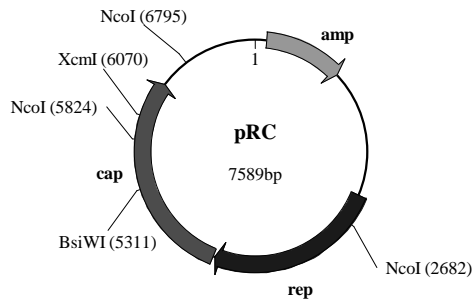
2.2.10.1 Beschreibung

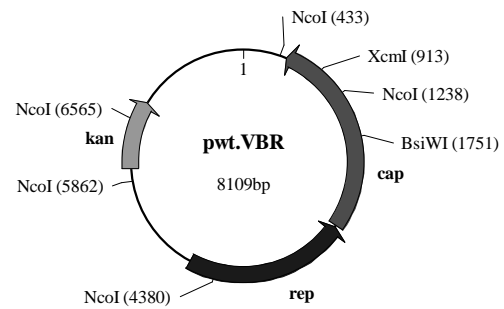
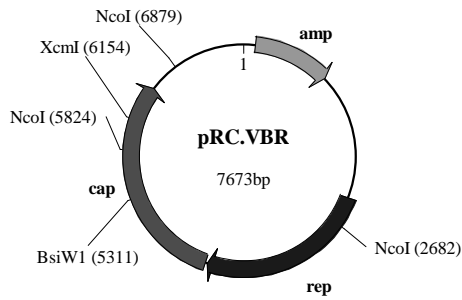
Die folgenden Plasmide wurden verwendet:

Name	Beschreibung	Referenz
Pwt	wtAAV2-Genom (rep-cap flankiert von ITRs) kloniert in pUC19. Im pUC19 Rückgrat befindet sich ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Das Plasmid wurde von der Firma MediGene AG (Martinsried) bezogen	(Ried et al. 2002)
pwt.oen	AAV2 Genom mit NotI-AscI-Stopmutations-Linker in I-587 umklontiert in peGFPC1-Backbone mit Kanamycin-Resistenz. Austausch der carboxyterminalen Region des Cap-Genes gegen Version mit Stopmutation und Insertionsstelle für Oligonukleotide über NotI und AscI	(Perabo et al. 2003)
pRC	AAV2-Rep-Cap-Expressionsplasmid	(Girod et al. 1999)
PwteGFP-C1	GFP-kodierendes Plasmid. Insertion des AseI-MluI Fragments (blunt-ended) von peGFP-C1 (Clontech), das für den humanen Zytomegalovirus (HCMV) Enhancer/Promoter, eine modifizierte Version des GFP-Gens sowie die Polyadenylationskassette des Simian-Virus 40 (SV 40) kodiert, in den mit PpuMI und SnaBI gespaltenen puc-AV2 – Backbone (blunt-ended) zwischen die AAV2 ITRs.	
pXX6-80	Expressionsplasmid für die adenoviralen Helferproteine: VA, E2A, E4. Das Plasmid wurde freundlicherweise von R. J. Samulski (Universität North Carolina) zur Verfügung gestellt.	
pZNL	Insertion des BglII-Fragment von pAD-LacZ in die SnaBI-SnaBI Stellen von psub2001. Das erhaltene Plasmid kodiert für LacZ. Es wird in dieser Arbeit als Negativkontrolle verwendet.	(Girod et al. 1999)

2.2.10.2 Restriktionskarten

Von den folgenden Plasmiden werden in dieser Arbeit Restriktionsanalysen durchgeführt:





2.2.11 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	Hybaid
Brutschränke	Heraeus, Hanau
DotBlot Apparatur	Gibco BRL
Eagle-Eye	Stratagene, La Jolla
ELISA Reader	Molecular Devices, Ismaning
FACS-Gerät	Beckmann Coulter, Krefeld
Lightcycler	Roche, Basel
Lichtmikroskop	Leica DM IRB
Pipettensatz: 2µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Gilson, Middleton
Rollhybridisierer	Hybaid, Heidelberg
Schüttelinkubator	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Spektrophotometer	Beckman Coulter, Krefeld
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Tischzentrifuge	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Ultraviolett-Mikroskop	Zeiss, Jena
Ultrazentrifuge für „kleine“ Gradienten	Sorvall, Langenselbold
Ultrazentrifuge für „große“ Gradienten	Beckman Coulter, Krefeld
Vortexer	Bender und Hobein, Zürich
Wasserbad	GFL, Burgedel

Zentrifuge für 50ml Reaktionsgefäße

Heraeus, Hanau

Zentrifuge für 0,5l -Gefäße

Sorvall RC 5C, Langenselbold

2.3 Methoden

2.3.1 Design von Oligonukleotiden und Simulation von Klonierungen

Die Planung der Klonierungen wurde mit der Software *DNAman* (Lynnon Corp., Vaudreuil) durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden so entwickelt, dass sie neben dem Peptid V1, K237 bzw. VBR für 3 carboxyterminal und 2 aminoterminal gelegene Alaninreste kodieren, die die unabhängige Faltung der Peptide im Kapsidkontext erleichtern sollen.

Es wurden folgende Sequenzen für den Bereich der Position I-587 geplant:

Klon	Sequenz um Position 587 von VP1
AAV2wt	SVSTNLQRGN-----RQAATADV
AAV2V1	SVSTNLQRGNAAAA ATWLPPRAA -----RQAATADV
AAV2K237	SVSTNLQRGNAAAA HTMYHHYQHHLAA -----RQAATADV
AAV2VBR	SVSTNLQRGNAAAN ITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLAARQAATADV

Tabelle 2: Sequenz der Konstrukte im Bereich I-587 (Position I-587 unterstrichen, Linkersequenzen kursiv, Insertionen fett und kursiv)

2.3.2 Bakterienkultivierung

2.3.2.1 Plattenkultur

Zur Herstellung von Agarplatten zur Kultivierung von Bakterien in semisolidem Medium wurde LB-Medium versetzt mit Agarose nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55°C in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Abkühlen wurden die Platten bei 4°C invertiert gelagert. Mit einer sterilen Impföse wurden Bakterien aus einer Flüssigkultur auf sterile LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C invertiert im Brutschrank inkubiert.

Zur Selektion von Bakterien, die Plasmide enthalten, wurde dem Medium zusätzlich das entsprechende Antibiotikum zugesetzt, für dessen Resistenzgen das jeweilige Plasmid kodiert.

2.3.2.2 Flüssigkultur

Von Plattenkulturen entnommene Einzelkolonien wurden in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überimpft und über Nacht bei 220 rpm und 37°C inkubiert.

2.3.2.3 Anlegen von Bakterienstocks

Einzelne Bakterien-Klone wurden auf Dauer gelagert, um bei Bedarf daraus neue Kulturen anlegen zu können. Hierzu wurde ein Milliliter einer Flüssigkultur mit dem betreffenden Bakterien-Klon in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit 70 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Anschließend wurde zur Vermischung der Bakterien mit DMSO das Eppendorf-Gefäß auf einem Vortexer geschüttelt und bei -20°C tiefgefroren.

Medium	Menge	Substanz
LB-Medium	1	% Bacto-Trypton
	0,5	% Yeast Extract
	0,5	% NaCl
	1	mM NaOH
	1,5	% Bacto-Agar (für Plattenkultur)

Antibiotikum	Konzentration	Bemerkung
Ampicillin	Stocklösung:	50 mg/ml in steril filtriertem H ₂ O
	Arbeitskonzentration:	100 µg/ml Flüssigmedien
		50 µg/ml in Platten
Kanamycin	Stocklösung:	50 mg/ml in steril filtriertem H ₂ O
	Arbeitskonzentration:	100 µg/ml Flüssigmedien
		50 µg/ml in Platten

2.3.3 Transformation von E. coli-Bakterien

2.3.3.1 Herstellung elektrokompenter E.coli

Unter sterilen Bedingungen wurden 10 ml autoklaviertes LB-Medium in einen 250 ml Erlenmeyer-Kolben gegeben und mit E. coli-Bakterien (DH10B) beimpft. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C und 120 rpm unter Schütteln bebrütet. Am nächsten Tag wurden 500 ml vorgewärmtes LB-Medium in einem 2-Liter-Erlenmeyer-Kolben mit 10 ml der Über-Nacht-Kultur inokuliert und wiederum bei 37°C geschüttelt. Die Bakterienlösung wurde so lange inkubiert, bis die optische Dichte des Mediums bei 600 nm (OD_{600}) einen Wert von 0,6 erreicht hatte. Dieser Wert ist ein Maß für die Zelldichte: bei 0,6 befindet sich eine sich vermehrende Bakterienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase. In diesem Zeitabschnitt geerntete Bakterien eignen sich besonders gut, um durch die im weiteren beschriebenen Schritte kompetent für die Aufnahme von Plasmid-DNA gemacht zu werden.

Danach wurden die Bakterien enthaltende Nährlösung auf Zentrifugengefäße verteilt und bei 7000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Sedimente wurden dann mit 50 ml eisgekühltem, autoklaviertem Wasser mit 10% Glycerol gewaschen und zusammengeführt. Dann wurde diese Bakterien-Suspension zweimal bei 7000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und mit 50 ml eisgekühlter, 10-prozentiger Glycerinlösung gewaschen. Schließlich wurde nach erneuter Zentrifugation das Pellet in 5 ml steriler, 10-prozentiger Glycerinlösung aufgenommen und aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.3.2 Transformation von DNA in elektrokompente E.coli

10 µl eines dialysierten Ligationsansatzes (30 min Membrandialyse gegen entsalztes Wasser) oder 0,1 µl aufgereinigte DNA (1 µg/µl in TE) wurden auf Eis mit 50 µl elektrokompenten DH10B gemischt und in Elektroporationsküvetten (Spaltbreite 1 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgte dann mit einer Spannung von 2,5 KV bei 400 Ω und 25 µF. Danach wurden die Bakterien mit 500 µl LB herausgespült und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Bakterien, die mit Kanamycinresistenz-tragenden Plasmiden transformiert wurden, wurden 2 h bei 37°C inkubiert, bevor sie auf das Selektionsmedium gegeben wurden, um die Expression des Resistenzgens gegen das bakterizide Kanamycin zu ermöglichen.

2.3.4 Präparation und Analyse von DNA

2.3.4.1 Präparation kleiner DNA-Mengen

Zur Analyse der in einzelnen Bakterienklonen enthaltenen DNA war häufig die Isolierung geringerer Plasmid-Mengen aus *E. coli* notwendig. Hierfür wurde das von der Firma Qiagen beziehbare *QIAprep Spin Miniprep Kit* mit zugehörigem Protokoll angewendet.

In einem Zentrifugenröhrchen wurden jeweils 5 ml LB-Medium mit den zu untersuchenden Bakterienklonen angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37 °C belassen. Am folgenden Tag wurde 1 ml der Bakteriensuspension zur weiteren Verwendung abgenommen und die restlichen 4 ml bei 4000 rpm 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Bakterienpellet in 250 µl P1-Puffer (Resuspensionspuffer) aufgenommen.

Nach Überführen in ein frisches Eppendorf-Gefäß wurden 250 µl P2-Puffer (Lysepuffer) hinzu gegeben und das verschlossene Gefäß 5-6 mal invertiert. Gleich darauf wurden 350 µl P3-Puffer (Neutralisationspuffer) hinzu pipettiert und danach das Eppendorf-Gefäß bei 14000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde auf *QIAprep*-Säulen pipettiert, die mit dem *QIAvac* Vakuumsauger verbunden wurden. Nach Durchsaugen des Überstandes wurden die Säulchen mit 500 µl PB-Puffer und 750 µl PE-Puffer gewaschen. Diese Puffer sind in den Qiagen-Kits enthalten, ihre Zusammensetzung ist nicht bekannt. Die DNA wurde dann mit sterilem H₂O von den Säulen eluiert.

2.3.4.2 Präparation endotoxinfreier DNA

Für die Herstellung von Viren durch Transfektion von Plasmiden in eukaryote Zellen wurde endotoxinfreie DNA in größeren Mengen benötigt. Hierfür wurden Anionenaustauschersäulen der Firma Qiagen eingesetzt. Es wurden Präparationen im „Maxi“- und „Mega“-Maßstab nach den Standardprotokollen und Systemkits Qiagen 500 und 2500 durchgeführt.

Zur Bakterien-Aufzucht wurden zunächst 5 ml LB-Medium (mit Selektionsantibiotikum) in einem Zentrifugenröhrchen mit dem entsprechenden Bakterienstamm beimpft. Nach 12 h bei 37°C im Schüttelinkubator (200 rpm) wurde dieser Ansatz in größere Mengen Kulturmedium (je nach Bedarf 25 ml bis 5 Liter) überführt und über Nacht bei gleich bleibenden Bedingungen weiter bebrütet.

Zur Plasmidisolation wurden am folgenden Tag die Bakterien abzentrifugiert (7000 rpm, 45 min, 4°C) und in P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von P2-Puffer wurde die Lösung vorsichtig mehrmals invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von P3-Puffer wurde abermals vorsichtig gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die so ausfallende chromosomale DNA und Proteinanteile konnten anschließend über Zentrifugation abgetrennt werden (9000 rpm, 40 min, 4°C).

Zur Endotoxin-Entfernung wurde danach „Endotoxin Removal“-Puffer, ein Bestandteil der Plasmidisolierungs-Kits, hinzugefügt und der Ansatz bei 4°C für 30 min inkubiert. Diese Lösung wurde dann auf mit QBT-Puffer äquilibrierte Säulen transferiert. Die Säulen wurden anschließend mit QC-Puffer mehrmals gewaschen und die DNA schließlich mit QF-Puffer eluiert. Die eluierte DNA wurde durch Zugabe von Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation pelletiert (4000 rpm, 60 min, 4°C). Das Pellet wurde nach Abgießen des Überstandes mit 70-prozentigem Äthanol gewaschen, erneut zentrifugiert (4000 rpm, 30 min, 4°C) und nach Verwerfen des Äthanol in der Sterilwerkbank in 150 bis 500 µl endotoxinfreiem TE-Puffer aufgenommen.

Teil 2 – Material und Methoden

Puffer	Menge		Substanz
P1-Puffer (Resuspensionspuffer)	50	mM	Tris/HCl, pH 8,8
	10	mM	EDTA
	100	µg/ml	RNaseA
P2-Puffer (Lysepuffer)	200	mM	NaOH
	1	%	SDS
P3-Puffer (Neutralisationspuffer)	3	M	KAc, pH 5,0
QBT-Puffer (Äquilibrierungspuffer)	750	mM	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 7,0
	15	%	Isopropanol
	0,15	%	<i>Triton X-100</i>
QC-Puffer (Waschpuffer)	1	M	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 7,0
	15	%	Isopropanol
QF-Puffer (Elutionspuffer)	1,25	M	NaCl
	50	mM	Tris/HCl, pH 8,5
	15	%	Isopropanol

2.3.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Die Agarose wurde in TBE-Puffer aufgeschlämmt, im Mikrowellenherd aufgeköcht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid bis zu einer Konzentration von 0,5 µg/ml versetzt. Das 0,8 %ige bis 2 %ige Agarosegel wurde in eine vorbereitete Form gegossen und nach dem Erstarren in eine entsprechende Gelapparatur eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt, und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese wurde in TBE-Puffer mit 30 bis 120 V durchgeführt. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe eines Transilluminators (*Eagle Eye*) durch UV-Absorption des interkalierten Ethidiumbromids bei einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht. Parallel

aufgetrennte DNA-Längenstandards erlaubten eine Abschätzung der Länge der DNA-Fragmente.

Puffer	Menge		Substanz
DNA-Auftragspuffer	50	mM	EDTA, pH 8,0
	10	%	Ficoll
	10	%	Glycerin
	0,01	%	BPB
10x TBE	890	mM	Tris
	890	mM	Borsäure
	20	mM	EDTA

2.3.4.4 Gelisolation von DNA mit *QIAEX II*

Zur Extraktion einzelner DNA-Banden aus Agarose-Gelen wurde das *QiaEx-II*-Kit von Qiagen eingesetzt. Die mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnittenen Gelstücke, die das gewünschte DNA-Fragment enthielten, wurden dabei mit dem dreifachen Volumen QX1-Puffer (Zusammensetzung nicht bekannt) und 10 µl Glasmilch versetzt und 10 min bei 50°C geschmolzen. Die an die Glasmilch gebundene DNA wurde daraufhin abzentrifugiert (30 s, 14000 rpm) und nach Abnehmen des Überstands einmal mit 500 µl QX1-Puffer sowie zweimal mit 500 µl PE-Puffer gewaschen (jeweils mit Zentrifugation 30 s bei 8000 rpm). Nach 5-10 min Trocknen bei RT wurde die gebundene DNA mit 20 µl Tris (20 mM pH 8,0) eluiert, die Glasmilch abzentrifugiert (30 s, 14000 rpm) und der DNA-haltige Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

2.3.4.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden mit einem Spektralphotometer bestimmt und computerunterstützt ausgewertet. Ein OD₂₆₀ Wert von 1 entspricht dabei einer Konzentration von ca. 50 µg/ml dsDNA.

Die Konzentration kleiner DNA-Mengen im Rahmen von Klonierungen wurde in einem Agarosegel durch Vergleich der Bandenintensität mit einem Längenstandard abgeschätzt, dessen einzelne Banden bekannte DNA-Konzentrationen aufweisen.

2.3.4.6 Herstellung von standardisierten DNA-Titern für DotBlot und Realtime-PCR

Zur Erzeugung von Plasmid-Lösungen mit bekanntem Titer (bekannter Zahl von Plasmid-Kopien pro Volumen Lösung) wurde zunächst die DNA-Konzentration des in Tris oder TE-Puffer gelösten Plasmids mittels Spektralphotometrie bestimmt wie in 2.3.4.5 beschrieben. Anschließend wurde daraus unter Miteinbeziehung des bekannten Molekulargewichts des Plasmids die Kopienzahl pro Volumeneinheit berechnet und die Lösung dann mit dem entsprechenden Puffer (Tris oder TE) auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

2.3.5 Modifikation von DNA

2.3.5.1 Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde für die Herstellung von Sonden, zur Klonierung und zur Kontrolle von Plasmiden eingesetzt. Für eine vollständige Restriktion wurden dabei zwischen 0,2 und 20 µg DNA mit 1 bis 10 U Enzym/µg eingesetzt. Die Spaltung erfolgte über ein bis zwölf Stunden bei der vorgegebenen Temperatur (meist 37°C) in 20 bis 100 µl Gesamtvolumen. Standardbedingungen wie erforderlicher 1x Restriktionspuffer, Temperatur und Restriktionsaktivität wurden den Herstellerangaben entnommen. Die Kontrolle der Spaltung bzw. die präparative Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

2.3.5.2 Dephosphorylierung von DNA

Zur Vermeidung unerwünschter Religationen durch die Aktivität der T₄-DNA-Ligase wurden die für das Resistenzgen kodierenden Vektor-DNA-Moleküle mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Es wurde eine intestinale Phosphatase aus Kälbern (New England Biolabs) verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNA, RNA und Nukleosidtriphosphaten. Da T₄-DNA-Ligase mindestens eine Phosphatgruppe an

einem Ende der zu verknüpfenden Enden für die Ligation benötigt, wird auf diese Weise eine Religation verhindert.

Die zu dephosphorylierende DNA wurde dazu in passendem Puffer und H₂O gelöst (0,5 µg DNA/10 µl Reaktionsvolumen). Dann wurden 0,5 U Alkalische Phosphatase pro µg Vektor-DNA hinzugegeben und der Ansatz 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA wie unter 2.3.4.4 beschrieben gereinigt.

2.3.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden durchgeführt mit 1 µl T4-Ligase, 2 µl 10x Ligase-Puffer, 1 µl Vektor-DNA (nach Gelextraktion) und 1-5 µl der zu inserierenden DNA (nach Gelextraktion) in einem Endvolumen von 20 µl Tris (20 mM, pH 8,0). Inkubiert wurden die Ansätze über Nacht bei 16°C. Vor der Transformation wurden die Ansätze 30 min membranalysiert.

2.3.5.4 Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden

Die komplementären Oligonukleotide wurden äquimolar in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert, kurz auf 95°C erhitzt und durch langsames Abkühlen auf Raumtemperatur hybridisiert.

2.3.5.5 Klonierung der pwt-Konstrukte

Zur Klonierung der pwt-Konstrukte wurde das Plasmid pwt.oen mit AscI und Not I gespalten und anschließend dephosphoryliert. Nach Agarosegelelektrophorese wurde das Backbone - Fragment ausgeschnitten und aufgereinigt. Nun wurde die Ligation mit den hybridisierten Oligonukleotidpaaren OBK 1/2, OBK 3/4 beziehungsweise OBK 5/6 durchgeführt.

2.3.5.6 Klonierung der pRC-Konstrukte

Zur Klonierung der pRC-Konstrukte wurden die Ausgangsplasmide pwtV1, pwtK237 und pwtVBR sowie das Vektor-Plasmid pRC mit BsiWI und XcmI gespalten. Die pRC-Spaltung wurde zusätzlich dephosphoryliert. Anschließend wurden die Ansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt. Bei den pRC-Fragmenten wurde das Vektorfragment, bei den pwt-Fragmenten

das die I-587-Position beinhaltende 0,8 kb-Fragment ausgeschnitten und aufgereinigt. Dann wurden die Inserts mit dem Backbone ligiert.

2.3.6 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden durch den hauseigenen Sequenzier-Service von Dr. Helmut Blum durchgeführt. Als Primer wurden 3201-for und 4066-back verwendet.

2.3.7 Isolierung von HUVEC

HUVEC wurden mit Zustimmung der Ethikkommission der LMU aus menschlichen Nabelschnüren isoliert, die uns freundlicherweise von der Neugeborenenklinik Großhadern überlassen wurden.

Die Nabelschnur wurde dazu unter sterilen Bedingungen an einem Stativ aufgehängt, die Umbilikalvene sondiert und mehrmals mit PBS gespült. Anschließend wurde die Vene mit α -Chymotrypsin in einer Endkonzentration von 1 mg/ml bei 37°C für 1 h inkubiert. Die abverdauten HUVEC wurden nun mit PBS ausgeschwemmt und in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Nach Abzentrifugation (10 min, 3000 rpm, RT) wurden die Zellen in Medium (ECGM, 2% FCS, 1% Pen/Strep) resuspendiert, in ein Zellkulturgefäß überführt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.3.8 Kultivierung von Zellen und Zellzahlbestimmung

Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärente, das heißt auf Oberflächen wachsende Zelllinien. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt in geeignetem Medium mit 1% Pen/Strep.

Die Zellen wurden je nach Teilungsrate 2-3 mal die Woche unter sterilen Bedingungen umgesetzt. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1% Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden in Verdünnungen von 1:5 bis 1:20 in frisches Medium aufgenommen.

Bei Experimenten, in denen eine definierte Zellzahl eingesetzt werden musste, wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. Dazu

wurden 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Der durchschnittliche Wert der Zellzahl pro Großquadrat (16 Kleinquadrate) mit 10^4 multipliziert entspricht der Zellzahl pro ml.

2.3.9 Virusproduktion, Aufreinigung und Lagerung

2.3.9.1 Virusproduktion

Für die Viruspräparation wurden in 15cm-Schalen je $7,5 \cdot 10^6$ HEK293-Zellen in DMEM mit 10% FCS und 1% Pen/Strep ausgesät. Für kleine Präparationen wurden pro Viruskonstrukt 3 Schalen, für große jeweils 15 Schalen angesetzt. Nach 24 Stunden wurde das Medium ausgetauscht und weitere 3 Stunden später die Plasmid-DNA durch Kalziumphosphat-Präzipitation in die Zellen transfiziert. Dabei wurden pro Schale 7,5 µg AAV-Helferplasmid (kodiert für rep und cap), 7,5 µg Transgen-Plasmid und 22,5 µg pXX6-80 eingesetzt, was in etwa einem molaren Verhältnis von 1:1:1 entspricht. Zur Vorbereitung des Transfektionsansatzes wurden die benötigten Plasmide in 1 ml 250 mM CaCl_2 pipettiert, gemischt, 1 ml HBS hinzugefügt und abermals gemischt. Bevor der Ansatz auf die Zellen gegeben wurde, wurde er 2 min bei RT inkubiert, um die Präzipitation zu ermöglichen. Nach Inkubation im Brutschrank für 24 h bei 37°C und 5% CO_2 wurde das Medium abermals abgenommen und durch DMEM mit 2% FCS ersetzt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen durch Abschaben geerntet und bei 3000 g pelletiert. Die Zellen wurden in 0,5 ml (für kleine Gradienten) bzw. 7,5 ml Lysepuffer (für große Gradienten) aufgenommen und 3x im flüssigen Stickstoff schockgefroren und im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut. Das virushaltige Zelllysate wurde dann mit Benzonase (50 U/ml) versetzt, um freie RNA und DNA abzubauen, während im Viruskapsid befindliche Nukleinsäure vor diesem Prozess geschützt bleibt. Nach 30 min bei 37°C wurden unlösliche zelluläre Bestandteile aus der Präparation abzentrifugiert (20 min, 3700 g). Das virushaltige, so vorgeklärte Lysat wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert.

Puffer	Menge		Substanz
HBS-	50	mM	HEPES
Transfektionspuffer	280	mM	NaCl
	1,5	mM	NaP
CaCl ₂ -Lösung	250	mM	CaCl ₂ in H ₂ O
Lysepuffer	150	mM	NaCl
	50	mM	Tris/HCl, pH 8,5

2.3.9.2 Virusaufreinigung durch Dichtegradientenultrazentrifugation

Für die Aufreinigung in kleinen Maßstab wurden in 3 ml-UZ-Röhrchen in aufsteigender Reihenfolge je 600 µl Iodixanollösungen mit 60%, 40%, 25% und 15% Iodixanol pipettiert, so dass im Röhrchen unten die 60%-Phase und darüber mit scharfen Grenzen die weiteren Phasen vorlagen. Auf diesen Gradienten wurde nun das virushaltige Lysat pipettiert, die Röhrchen mit der Feinwaage gegeneinander austariert und in den Rotor platziert. Die Ultrazentrifugation erfolgte dann für 60 min bei 74000 rpm. Danach wurden die Fraktionen mit einer 1000 µl - Pipette abgezogen, aliquotiert und bei –80°C tiefgefroren.

Für Präparationen im 15-Schalen-Maßstab wurden 1x3,5-inch-Quickseal®-Tubes verwendet. Hierin wurde ein Iodixanolgradient aufgebaut, indem die Viruslösung zunächst mit 15% Iodixanol (7 ml) dann mit 25% (5 ml), mit 40% (5 ml) und anschließend mit 60% (6 ml) unterschichtet wurde, und zum Schluss mit PBS/MK überschichtet wurde. Der Gradient wurde für eine Stunde in der Ultrazentrifuge mit 63000 rpm bei 18°C zentrifugiert und dann die einzelnen Phasen abgenommen.

Teil 2 – Material und Methoden

Puffer	Menge		Reagenz
15% Iodixanol	5	ml	10x PBS
	50	µl	MgCl ₂ , 1 M
	50	µl	KCl, 2,5 M
	10	ml	NaCl, 5 M
	12,5	ml	Optiprep
	75	µl	Phenolrot, 0,5%
	ad 50	ml	Sigma Wasser
25% Iodixanol	5	ml	10x PBS
	50	µl	MgCl ₂ , 1M
	50	µl	KCl, 2,5M
	20	ml	Optiprep
	100	µl	Phenolrot, 0,5 Prozent
	ad 50	ml	Sigma Wasser
40% Iodixanol	5	ml	10x PBS
	50	µl	MgCl ₂ , 1 M
	50	µl	KCl, 2,5 M
	33,3	ml	Optiprep
	ad 50	ml	Sigma Wasser
60% Iodixanol	50	µl	MgCl ₂ , 1 M
	50	µl	KCl, 2,5 M
	50	ml	Optiprep
	25	µl	Phenolrot

2.3.9.3 Lagerung der produzierten Viren und Vektoren

Die produzierten AAV2 wurden bei -80°C gelagert und vor ihrer weiteren Verwendung auf Eis wieder aufgetaut.

2.3.10 Präparation von DNA aus Zellen und Virusstock

2.3.10.1 Präparation von DNA aus Virusstocklösung

Die Präparation von DNA aus Virusstocklösung wurde mit Hilfe des *DNEasy*-Kits von Qiagen durchgeführt. Eine geeignete Menge des Virusstocks (10-20 µl) wurde zunächst mit PBS auf 200 µl Endvolumen aufgefüllt und dann mit 20 µl Proteinase und 200 µl AL-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde nun durch Vortexen gut gemischt und 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wurden 200 µl reiner Äthanol zugegeben und wieder auf dem Vortexer gemischt. Dieser Ansatz wurde dann auf eine *DNEasy*-Säule pipettiert, welche in einem Sammel-Reaktionsgefäß bei 8000 rpm eine Minute zentrifugiert wurde. Mit 500 µl AW1-Puffer wurde die Säule gewaschen und erneut bei 8000 Umdrehungen eine Minute zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl AW2-Puffer und einer dreiminütigen Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde die Säule in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 210 µl AE-Puffer direkt auf die *DNEasy*-Membran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute bei Raumtemperatur wurde zur Elution der DNA die Säule noch einmal eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert und die eluierte Nukleinsäure in dem Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.3.10.2 Präparation von DNA aus adhärenenten Zellen

Bei der Präparation von DNA aus adhärenenten Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit einem geeigneten Volumen PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA 5-8 min bei 37°C mobilisiert. Nach Abstoppen des Verdaus durch Zugabe von FCS-haltigem Medium wurden die Zellen in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3 min, 3000 rpm) und zweimal mit 800 µl PBS gewaschen (jeweils mit Abzentrifugation 3 min bei 3000 rpm). Anschließend wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und mit dem *DNEasy*-Kit behandelt (wie in 2.3.10.1 beschrieben).

2.3.11 Benzonase-Verdau der Viruspräparationen

20 µl der Viruspräparation wurden mit PBS auf 200 µl Volumen aufgefüllt, dann mit 4 µl Benzonase (Endkonzentration 50 U/ml) versetzt, durch Vortexen gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden 2 µl Plasmid-DNA (pwtEGFP-C1, 10⁸ Kopien/µl) in 18

µl 40% Iodixanol pipettiert und dann wie die Viruspräparationen weiterbehandelt. Die Benzonase wurde anschließend 15 min bei 95°C inaktiviert. Danach wurde eine DNA-Extraktion mit dem *DNeasy*-Kit durchgeführt wie unter 2.3.10.2 beschrieben.

2.3.12 Bestimmung genomischer Titer durch DotBlot

Zur Bestimmung des Gehalts an DNA-haltigen Viruspartikeln in einer Viruspräparation, das heißt zur Ermittlung des genomischen Titers, wurde die virale DNA zunächst mit dem *DNeasy*-Kit (Qiagen) isoliert wie unter 2.3.10.1 beschrieben. Von den Eluat sowie der Standard-Probe und Negativ-Kontrolle wurden anschließend in einer 96-Well-Platte 1:1-Verdünnungsreihen angelegt. Dazu wurde eine jeweils geeignete Menge Eluat (2-40 µl) in einem Endvolumen von 200 µl in 2 M NaOH denaturiert und in ein Well der erste Reihe der Platte überführt. Die restlichen Wells wurden mit je 100 µl 2 M NaOH gefüllt. Anschließend wurde mit Hilfe einer Multikanalpipette die serielle 1:1-Verdünnung erstellt. Dazu wurden die Reihen mit der Multikanalpipette gemischt und anschließend wurde aus jedem Well 100 µl in die nachfolgende Reihe überführt. Die 100 µl abgenommene Lösung des letzten Wells wurde verworfen. Nach Denaturierung (60 min, 37°C) wurde die DNA mit einer Vakuum-Vorrichtung auf eine positiv geladene Nylonmembran geblottet und dort durch Hitze (2 h, 80°C) fixiert.

Danach wurde die Membran in ein Hybridisierungsrohr platziert und im Rollinkubator 15 min bei 42°C in 20 ml SDS-Hybridisierungslösung prähybridisiert. Vor dem Ende der Prähybridisierung wurde eine Digoxigenin-markierte DNA-Sonde gewünschter Spezifität in 15 ml SDS-Hybridisierungslösung (Endkonzentration 15 ng/ml) 10 min bei 95°C denaturiert und im NaCl/Eisbad schockgeköhlt. Die Prähybridisierungslösung wurde gegen die Hybridisierungslösung ausgetauscht und die Membran über Nacht im Rollinkubator bei 42°C hybridisiert.

Die Membran wurde am nächsten Morgen, entsprechend 8-12 h Inkubation, 2 mal je 5 min in 2x SSC-Waschlösung bei RT, 2 mal 15 min in 0,1x SSC-Waschlösung bei 65°C gewaschen, um die unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Danach wurde die Membran durch einminütige Inkubation in Waschpuffer bei RT äquibriert. Zur Chemolumineszenz-Detektion wurde die Membran nach der Hybridisierung 30 min in Blockierungspuffer im Rollinkubator bei RT inkubiert und anschließend wiederum 30 min in 15 ml

Blockierungspuffer mit an alkalische Phosphatase gekoppelten, 1:10000 verdünntem anti-Digoxigenin-Antikörper inkubiert.

Die Membran wurde hierauf 2 mal 15 min bei RT in Waschpuffer gewaschen, um den unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran 1 min in Detektionspuffer äquilibriert. Währenddessen wurde das Chemolumineszenzsubstrat *CSPD* in Detektionspuffer im Verhältnis 1:100 verdünnt (500 µl Gesamtvolumen pro Membran). Die Membran wurde mit der vorbereiteten Lösung überschichtet und 5 min bei RT inkubiert. Nach dem Einschweißen in Folie erfolgte eine Inkubation bei 37°C im Brutschrank über 20 min. Die Membran wurde hierauf in einer Filmkassette gegen einen Röntgenfilm (Kodak *Biomax*) zwischen 3 min und einer Stunde exponiert und der Film zuletzt in einem Standardprozess entwickelt.

Teil 2 – Material und Methoden

Puffer	Menge		Substanz
SDS-Hybridisierungslösung	125	mM	Na ₂ HPO ₄ , pH 7.2
	250	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	45	%	Formamid
	7	%	SDS
2x SSC-Waschlösung	2	x	SSC
	0,1	%	SDS
0,1x SSC-Waschlösung:	0,1	x	SSC
	0,1	%	SDS
20x SSC-Puffer	3	M	NaCl
	300	mM	Natriumcitrat, pH 7.0
Maleinsäurepuffer	100	mM	Maleinsäure, pH 7.5
	150	mM	NaCl
Blockierungspuffer	90	%	Maleinsäurepuffer
	10	%	Blockierungsreagenz
Waschpuffer	99,7	%	Maleinsäurepuffer
	0,3	%	Tween-20
Detektionspuffer	100	mM	Tris/HCl, pH 9.5
	100	mM	NaCl

2.3.13 Bestimmung genomischer Titer durch Realtime-PCR des GFP-Gens

Alternativ zum DotBlot wurde der Titer EGFP-kodierender Viren durch Realtime-PCR am *Lightcycler* (Roche) bestimmt. Durchgeführt wurde die PCR mit den Primern EGFP-1 forward und EGFP-1 reverse und den Reagenzien des *LC-1 FastStart DNA Master SYBR Green Kits* (Roche).

Teil 2 – Material und Methoden

Pro Ansatz wurden verwendet:

Reagenz	Konzentration	Menge
cDNA		2 µl
H ₂ O, PCR-rein		14,2 µl
MgCl ₂	25 mM	1,6 µl
EGFP-1 forward Primer	100 pM	0,1 µl
EGFP-1 reverse Primer	100 pM	0,1 µl
LC – FastStart DNA Master SYBR Green I	10 x	2 µl

Eine Standardprobe und eine Negativkontrolle (H₂O, PCR-rein) wurden mitgeführt. Die Proben wurden lichtgeschützt im Kühlblock behandelt. Nach Pipettieren in die Glaskapillaren und Aufstecken der Plastikdeckel wurden die Ansätze zunächst zentrifugiert (2000 rpm, 30 s). Anschließend wurden die Kapillaren in den Rotor des *Lightcyclers* platziert.

Die geräteeigene Steuerungssoftware wurde mit folgenden Parametern programmiert:

Program	Cycles	Analysis mode	Temperature	Temperature Transition Rate	Duration	Acquisition Mode
Denaturierung	1	None	95°C	20°C/sec	600 sec	none
Amplifikation	35	quantification	95°C	20°C/sec	10 sec	none
			63°C	20°C/sec	3 sec	none
			72°C	20°C/sec	20 sec	single
Schmelzen	1	melting curves	95°C	20°C/sec	0 sec	none
			68°C	20°C/sec	10 sec	none
			95°C	0.1°C/sec	0 sec	continuous
Kühlen	1	None	40°C	20°C/sec	30 sec	none

Zur Auswertung wurde eine Schwelle durch den exponentiell verlaufenden Bereich der Messungen gelegt. Das Auswertungsprogramm gibt dann für jede Probe den „crossing point“ (CP) an, das heißt den Zyklus, bei dem die Schwelle durchschritten wird. Die Amplifikationseffizienz (AE) wurde einmalig durch Erstellen einer Standardkurve bestimmt. Hierzu wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe des Standards von 10⁸-10⁵ gemessen. Das

Auswertungsprogramm errechnet daraus durch lineare Regression die Amplifikationseffizienz. Durch Vergleich mit der Standardprobe und exponentielle Umrechnung lässt sich der genomische Titer einer Virusbildung bestimmen:

$$\text{Titer} = \text{Standardtiter} * AE^{(CP_{\text{Probe}} - CP_{\text{Standard}})}$$

Alternativ wurde die automatische Auswertfunktion des Steuerprogramms verwendet, die den Schwellenzyklus an der Stelle des Maximums der zweiten Ableitung der Messkurven festsetzt. Nach Import einer einmal aufgenommenen Standardkurve und Definition eines Referenzstandards bestimmt das Auswertungsprogramm automatisch die Titer.

2.3.14 Realtime-PCR für das Viruskapsid-Gen

Die PCR für das Viruskapsid-Gen wurde analog zur soeben beschriebenen PCR des GFP-Gens durchgeführt. Folgender Ansatz erwies sich als optimal:

Reagenz	Konzentration	Menge
cDNA		2 µl
H ₂ O, PCR-rein		12,6 µl
MgCl ₂	25 mM	3,2 µl
3021-forward Primer	100 pM	0,1 µl
4066-back Primer	100 pM	0,1 µl
LC – FastStart DNA Master SYBR Green I	10 x	2 µl

Die PCR wurde wie folgt programmiert:

Program	Cycles	Analysis mode	Temperature	Temperature Transition Rate	Duration	Acquisition Mode
Denaturierung	1	none	95°C	20°C/sec	600 sec	none
Amplifikation	35	quantification	95°C	20°C/sec	10 sec	none
			60°C	20°C/sec	3 sec	none
			72°C	20°C/sec	35 sec	single
Schmelzen	1	melting curves	95°C	20°C/sec	0 sec	none
			68°C	20°C/sec	10 sec	none
			95°C	0.1°C/sec	0 sec	continuous
Kühlen	1	none	40°C	20°C/sec	30 sec	none

2.3.15 Bestimmung des Kapsid-Titers durch ELISA

Geeignete Mengen des Virusstocks (2-20 µl) sowie einer Standardprobe ($5,5 \cdot 10^9$ Kopien / µl, bestimmt durch Elektronenmikroskopie bei Prof. Kleinschmidt, Heidelberg) wurden mit PBS auf 200 µl Volumen aufgefüllt. Dann wurden in einer Maxisorp-Platte 1:1-Verdünnungsreihen in PBS angelegt, analog wie für den DotBlot (siehe Kapitel 2.3.12) bereits beschrieben.

Da zum Teil relativ große Mengen an Viruspräparationen eingesetzt wurden, die ein hohes Hintergrundsignal verursachten, wurden für jede Virusvariante 2 identische Verdünnungsreihen angelegt. Die zweite Spalte wurde nicht mit dem Primärantikörper A20 versetzt, ansonsten jedoch analog zur ersten Spalte behandelt und stellte somit den unspezifischen Hintergrund dar.

Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Überstände abgenommen, die Platte wurde 3x mit 200 µl Waschpuffer pro Well gewaschen und anschließend über 2 Stunden mit 200 µl Blockierungspuffer pro Well blockiert. Der Blockierungspuffer wurde je nach Reihe entweder durch 100 µl A20 Hybridomüberstand pro Well ersetzt oder belassen. Die Platte wurde nun für 1,5 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wie oben gewaschen und für eine weitere Stunde mit 100 µl Biotin konjugierten anti-Maus-Antikörper inkubiert (1:50000 Verdünnung in Blockierungspuffer). Es wurde erneut dreimal

mit dem Waschpuffer gewaschen. Es folgte eine Stunde Inkubation mit je 100 µl Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (1:1000 Verdünnung in Blockpuffer). Es wurde dreimal mit Waschpuffer und zweimal mit Wasser gewaschen. Die Platte wurde mit je 100 µl Substrat versetzt, und die Reaktion nach 5 bis 10 Minuten mit je 50 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt. Die Intensität der Farbreaktion wurde in einem ELISA-Messgerät („ELISA-Reader“) bei 450 nm bestimmt. Von dem Kapsidstandard wurde eine Titrationskurve erstellt. Durch Vergleich der Werte der einzelnen Viren im linearen Bereich der Standardkurve konnte unter Einbeziehung der Verdünnung die Kapsidkonzentration der eingesetzten Virusproben errechnet werden.

Puffer	Substanz	Menge	
Waschpuffer	Tween20	25	µl
	PBS	50	ml
Blockierungspuffer	10% BSA in PBS	15	ml
	Saccharose	2,5	g
	Tween 20	25	µl
	PBS	ad 50	ml
Substrat	TMB	1,0	mg
	DMSO	100	µl
	0,1M NaOAc pH 6,2	10	ml
	30% H ₂ O ₂	1,0	µl

2.3.16 Immunologischer Nachweis von KDR

Zum Nachweis von KDR auf der Oberfläche von Zellen wurde eine immunologische Nachweisreaktion wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Böldicke et al. 2001). Die adhärennten Zellen wurden durch Abkratzen von der Kulturschale gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Abzentrifugieren (3 min, 400 g) wurden die Zellen einmal in 500 µl PBS mit 2% BSA gewaschen und wieder abzentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl des in PBS / 2% BSA verdünnten, e-tag-markierten synthetischen anti-KDR-Antikörpers zugegeben (Konzentration 0,5 µg/ml) zugegeben und die Zellen sorgfältig resuspendiert. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C unter ständigem Schütteln wurden die Zellen

abzentrifugiert, einmal mit PBS / 2% BSA gewaschen (wie soeben beschrieben) und dann mit dem murinen Zweit-Antikörper (Anti-e-tag-Antikörper) versetzt (Antikörper 1/2500 verdünnt in 500 µl PBS / 2% BSA). Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und einmal in FCS / 2% BSA gewaschen, um dann mit dem Drittantikörper (FITC-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper, 1:125 verdünnt in PBS / 2% BSA) versetzt zu werden. Der Ansatz wurde wiederum 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal gewaschen, in PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die FITC-Aktivität durchflusszytometrisch gemessen.

2.3.17 Infektion von Zellen

Zu infizierende Zellen wurden zunächst abtrypsiniert und wie in 2.3.8 beschrieben ausgezählt. Eine geeignete Anzahl Zellen ($2-5 \cdot 10^4$ Zellen) wurden dann in jeweils einen Napf einer 24-Well-Platte pipettiert und mit Medium homogen verteilt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden exemplarisch die Zellen eines Wells ausgezählt. Nach diesem Wert wurden dann die zu applizierenden Vektormengen berechnet. Wo gewünscht, wurde 30 min vor Infektion Heparin (5000 IE/ml) in einer Endkonzentration von 85 µl/ml zugesetzt. Der Vektorstock wurde, falls es die Dosierung erforderlich machte, in PBS verdünnt, und anschließend auf die Zellen pipettiert. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Infektionen mit 10^4 genomischen Partikeln pro Zellen durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für 2 Tage bei 37°C inkubiert, wenn nicht anders beschrieben, und dann durchflusszytometrisch gemessen.

2.3.18 Durchflusszytometrie

Die adhärenenten Zellen wurden wie in 2.3.8 beschrieben trypsiniert und anschließend abzentrifugiert (10 min, 300 rpm). Dann wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 500 µl PBS sorgfältig resuspendiert und in die FACS-Röhrchen überführt.

Bei jedem Versuch wurde das Gerät zunächst mit nicht transduzierten Kontrollzellen justiert. Dabei wurden die Schwellen von Vorwärts- und Seitwärts-Streuung des Lasers so gewählt, dass > 90% der Zellen im erfassten Bereich liegen. Die Schwelle der GFP-Messung wurde so

gelegt, dass knapp unter 1% der erfassten Kontroll-Zellen als GFP-positiv gewertet wurden. Diese Prozentzahl wurde bei der Auswertung der Messungen der interessierenden Zellen als unspezifisches Hintergrundsignal abgezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung der Mutanten

Da die relativ großen Epitope K237 und VBR eine stärkere Beeinträchtigung der Verpackungseffizienz erwarten ließen, wurden die Insertionen zunächst in das Wildtyp-Plasmid pwt kloniert, da sich mit wt-Konstrukten erfahrungsgemäß etwa um eine Zehnerpotenz höhere Virustiter erzielen lassen als mit rekombinanten AAV-Konstrukten.

Die Klonierung der Mutanten ließ sich problemlos durchführen, eine Kontrollspaltung mit NcoI und XcmI lieferte folgendes Bild:

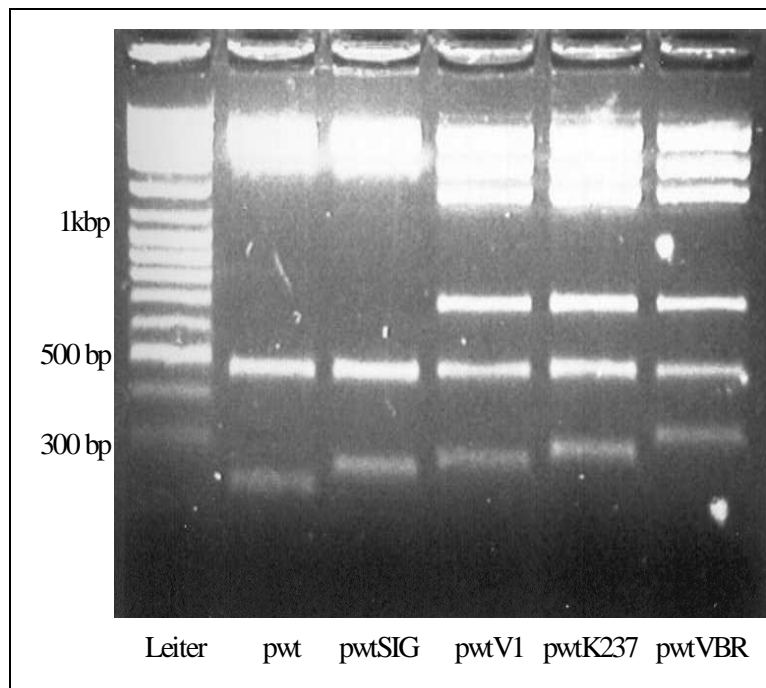


Abbildung 2: Restriktionsanalyse der klonierten wt-Konstrukte. pwtV1, pwtK237 und pwtVBR wurden mit NcoI und XcmI gespalten und anschließend auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrollen wurden pwt und pwtSIG mitgeführt und analog behandelt. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurde parallel ein Größenmarker („Leiter“) aufgetragen.

Die I-587-Position und somit auch die Insertionen liegen in dem Bereich des Plasmids, der sich im Gel als jeweils unterste Bande darstellt (Größe ungefähr 250-330 Basenpaare). Der Größenzuwachs dieses Fragments mit Zunahme der Länge der Insertion ist zu erkennen.

Die unterschiedlichen Bandenmuster von pwt und pwtSIG im Vergleich zu den übrigen Konstrukten im oberen und mittleren Bereich des Gels erklären sich durch leicht unterschiedliche Plasmidbackbones.

3.2 Sequenzierung der Konstrukte

Von je einem Klon der Expressionsplasmide wurden die in I-587 eingefügten Nukleotidabschnitte und die umgebende Region um I-587 mit dem Primer 3201-For sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen entsprachen der Erwartung.

3.3 Produktion der wt-Konstrukte

Nachdem die benötigten Plasmide vorlagen, wurden die entsprechenden Mutanten in HEK293-Zellen produziert. Die Effizienz der Produktion wurde dann durch DotBlot und ELISA untersucht.

3.3.1 Genomischer Titer im DotBlot

Um die Produktionseffizienz der Mutanten auf genomischer Ebene zu quantifizieren, wurde ein DotBlot durchgeführt. Dazu wurde die DNA aus der 40%-Iodixanol-Fraktion des Ultrazentrifugendichtegradienten isoliert, denaturiert und auf eine Membran transferiert. Anschließend wurden durch Hybridisierung mit einer markierten Sonde, die für das Kapsidgen von AAV2 spezifisch ist, die DNA-Mengen in den Fraktionen abgeschätzt („DotBlot“, Abbildung 3).

Es mussten bei den Mutanten größere Mengen des DNA-Eluats aufgetragen werden, um vergleichbare Signalintensitäten zu erhalten.

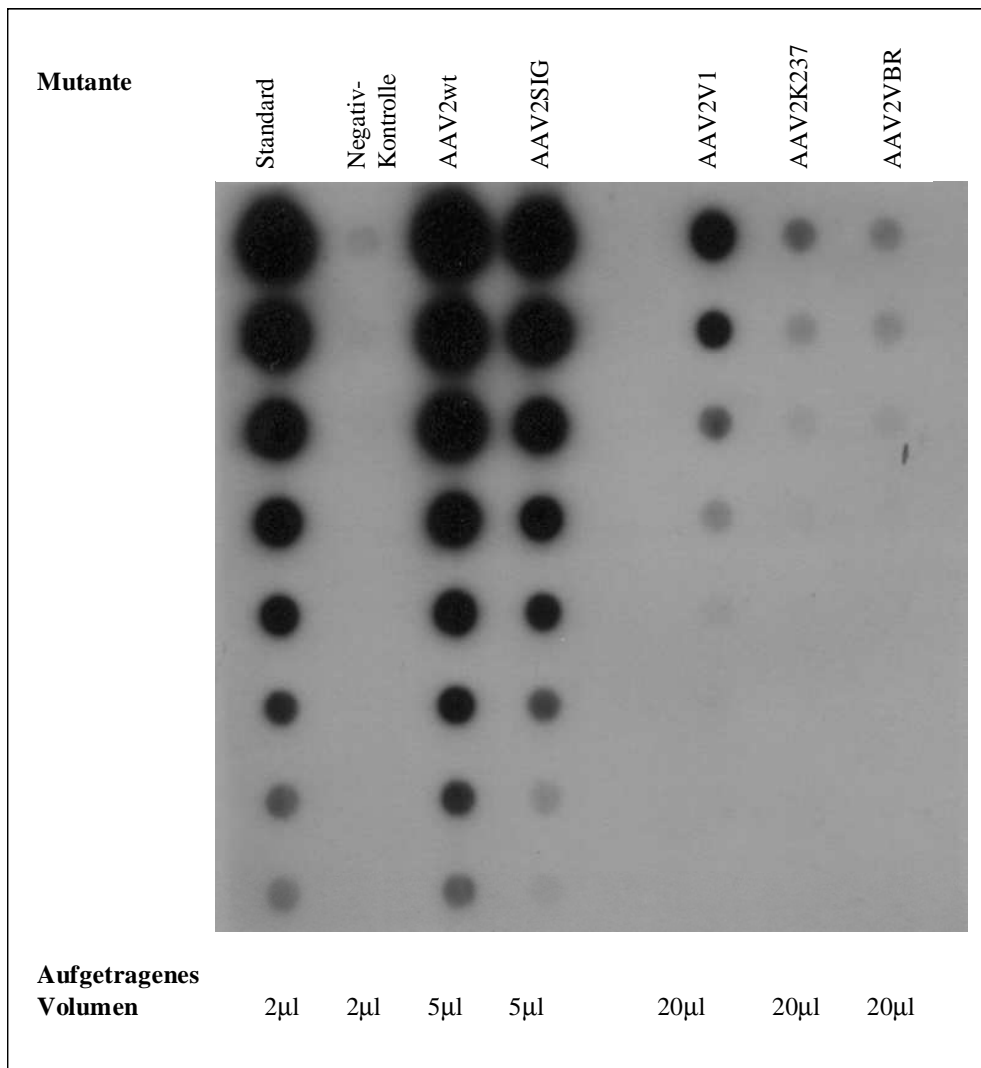


Abbildung 3: Analyse der Verpackungseffizienz der wt-Konstrukte im DotBlot. Virale DNA aus der jeweils angegebenen Menge (2-20µl) der 40% Iodixanol-Fraktion wurde nach Denaturierung auf eine Membran transferiert. Als Standard wurde das Plasmid pwt ($3,2 \cdot 10^9$ Kopien /µl), als Negativkontrolle das Plasmid pZNL ($3,2 \cdot 10^9$ Kopien /µl) mitgeführt und analog behandelt. Von allen Proben wurden 1:2-Verdünnungsreihen angelegt, die von oben nach unten dargestellt sind. Die fixierte DNA wurde anschließend mit einer spezifischen Sonde hybridisiert und durch eine daran gekoppelte Nachweisreaktion sichtbar gemacht.

Aus dem DotBlot ließen sich durch Vergleich mit dem Standard ($3,2 * 10^9$ Kopien / μl) folgende Titer abschätzen:

Mutant	Genomischer Titer
AAV2wt	$1 * 10^9 / \mu\text{l}$
AAV2SIG	$5 * 10^8 / \mu\text{l}$
AAV2V1	$8 * 10^7 / \mu\text{l}$
AAV2K237	$1 * 10^7 / \mu\text{l}$
AAV2VBR	$5 * 10^6 / \mu\text{l}$

Tabelle 3: Genomischer Titer der Wildtyp-Konstrukte. Aus dem DotBlot (Abbildung 3) abgeschätzte Titer von AAV2wt, AAV2SIG, AAV2V1, AAV2K237 und AAV2VBR in der 40%-Iodixanol-Fraktion des Ultrazentrifugations-dichtegradienten.

Die Mutanten haben also eine um den Faktor 10-200 geringere Verpackungseffizienz als der Wildtyp. Vor allem die langen Insertionen K237 und VBR beeinträchtigen die Verpackungseffizienz erwartungsgemäß in erheblichem Maße.

3.3.2 Kapsid-Titer im ELISA

Um zu untersuchen, ob auch strukturell intakte Kapside produziert worden sind, wurde ein ELISA mit dem A20-Antikörper durchgeführt, der eine von der Tertiärstruktur des AAV2-Kapsids abhängende Affinität zu AAV2 hat (Wistuba et al. 1995).

Die Mutanten AAV2K237 und AAV2VBR zeigten bei einem starken Hintergrundsignal ein nur sehr geringes A20-spezifisches Signal, das sich nicht der Verdünnungsgeometrie entsprechend verhielt. Es war daher keine Quantifizierung des Titers möglich, weswegen man lediglich von einem qualitativen Nachweis intakter Kapside sprechen kann.

Mutante	Kapsid-Titer
AAV2wt	$4,5 * 10^8 / \mu\text{l}$
AAV2V1	$2,9 * 10^7 / \mu\text{l}$
AAV2K237	*
AAV2VBR	*

Tabelle 4: Kapsid-Titer der wt-Konstrukte. Messung durch ELISA mit A20-Antikörper gegen die immobilisierten Kapside.

3.4 Umklonierung in pRC

Nachdem gezeigt worden war, dass sich intakte Kapside produzieren lassen, wurde der für die I-587-Position kodierende Bereich der Plasmide in die entsprechende Region des Plasmids pRC umkloniert. pRC enthält die Gene für Rep und Cap, nicht jedoch die Verpackungssignale. So können Viren hergestellt werden, deren Genom nicht mehr für AAV2 rep und cap kodiert, sondern für das leicht zu messende Reportergen GFP. Mit solchen rekombinanten AAV2s (rAAV2s) lässt sich die Infektion einer Zelle leicht durch die Expression von GFP messen.

Die Klonierung erfolgte durch Einsetzen der die Insertionen enthaltenden BsiWI-XcmI-Fragmente der pwt-Varianten anstelle des wildtypischen BsiWI-XcmI-Fragmentes in pRC.

Die Kontrollspaltung der pRC-Konstrukte zeigte das erwartete Ergebnis:

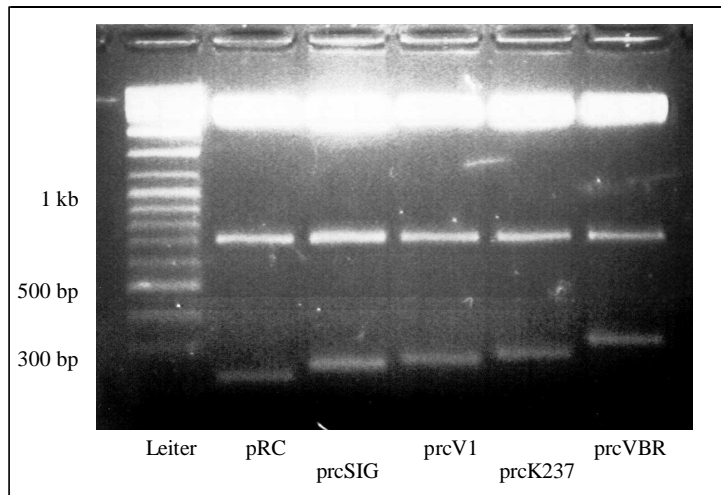


Abbildung 4: Restriktionsanalyse der klonierten pRC-Konstrukte. PrcV1, prcK237 und prcVBR wurden mit NcoI und XcmI gespalten und anschließend auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrollen wurden pRC und prcSIG mitgeführt und analog behandelt. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurde parallel ein Größenstandard („Leiter“) aufgetragen.

Die Insertion liegt wie bei Abbildung 2 in dem Plasmidbereich, der sich im Gel als die jeweils unterste Bande darstellt.

3.5 Produktion der pRC-Konstrukte

3.5.1 Genomischer Titer im DotBlot

Der DotBlot der 40%-Iodixanol-Fraktion ergab folgendes Ergebnis:

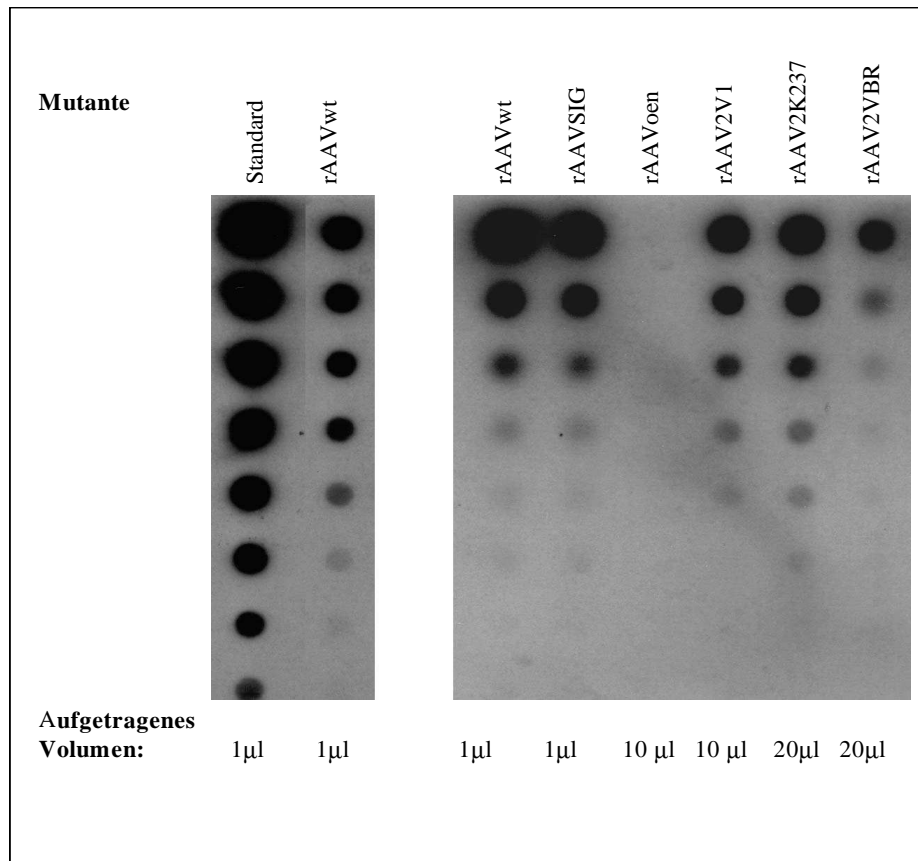


Abbildung 5: Analyse der Verpackungseffizienz der pRC-Konstrukte im DotBlot. Virale DNA aus der jeweiligen Menge (1-20 µl) der 40% Iodixanol-Fraktion wurde nach Denaturierung mit NaOH auf eine Membran transferiert. Zum Vergleich wurden DNA-Fractionen von rAAV2wt und rAAV2SIG parallel analysiert. Als Standard wurde das Plasmid pRC, als Negativkontrolle das Plasmid pZNL mitgeführt und analog behandelt. Von allen Proben wurden 1:2-Verdünnungsreihen angelegt, die von oben nach unten dargestellt sind. Die fixierte DNA wurde anschließend mit einer spezifischen Sonde hybridisiert und durch eine daran gekoppelte Nachweisreaktion sichtbar gemacht.

Es ließen sich folgende Titer abschätzen:

Mutant	Genomischer Titer
rAAV2wt	$2 * 10^8 / \mu\text{l}$
rAAV2SIG	$2 * 10^8 / \mu\text{l}$
rAAV2V1	$2 * 10^7 / \mu\text{l}$
rAAV2K237	$1 * 10^7 / \mu\text{l}$
rAAV2VBR	$3 * 10^6 / \mu\text{l}$

Tabelle 5: Genomischer Titer der pRC-Konstrukte. Abschätzung aus dem in Abbildung 5 dargestellten DotBlot.

3.5.2 Genomischer Titer in der Realtime-PCR

Eine Alternative zur Quantifizierung des genomischen Titers durch DotBlot stellt die quantitative PCR dar, die wesentlich schneller durchzuführen ist und, wie Messungen mit Standardverdünnungsreihen zeigten, auch einen deutlich größeren Messbereich hat.

Für die Virusstocks ergaben sich folgende Titer:

Mutant	berechneter Titer
rAAV2wt	$2,8 * 10^8 / \mu\text{l}$
rAAV2SIG	$1,9 * 10^8 / \mu\text{l}$
rAAV2V1	$1,0 * 10^8 / \mu\text{l}$
rAAV2K237	$9,5 * 10^6 / \mu\text{l}$
rAAV2VBR	$2,2 * 10^6 / \mu\text{l}$

Tabelle 6: Genomischer Titer der rAAV-Konstrukte bestimmt durch die Realtime-PCR-Methode.

3.5.3 Vergleich von DotBlot und Realtime-PCR

Ein Vergleich der durch DotBlot und Realtime-PCR bestimmten Titer zeigt die Äquivalenz der beiden Methoden:

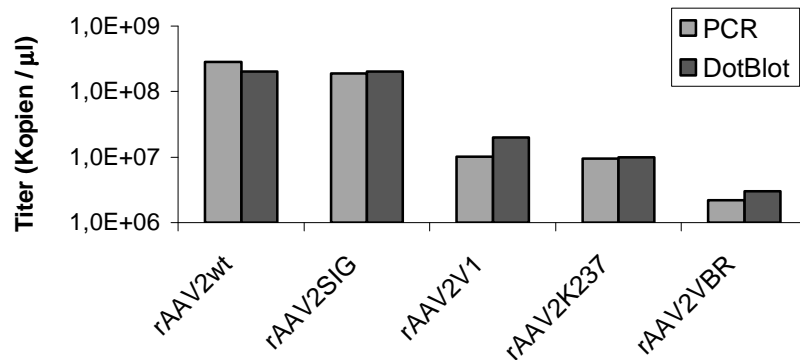


Abbildung 6: Vergleich der durch DotBlot und Realtime-PCR erhaltenen Titer der 40%-Iodixanolfractionen der Ultrazentrifugationsgradienten. Logarithmische Darstellung der Titer auf der y-Achse.

DotBlot und PCR weichen maximal um den Faktor 2 voneinander ab, ein für die relativ geringe Genauigkeit des DotBlots gutes Ergebnis. Die mathematische Auswertung ergab ferner einen Korrelationskoeffizienten von 0,88.

3.5.4 Genomischer Titer aller Phasen der Ultrazentrifugationsgradienten

Um auszuschließen, dass sich die Viruskonstrukte aufgrund ihrer größeren Partikelmasse in einer anderen Phase akkumulieren als der Wildtyp, wurde eine quantitative PCR aus DNA-Extrakten aller 4 Phasen des Ultrazentrifugationsgradienten durchgeführt.

Teil 3 - Ergebnisse

Es ergaben sich folgende Titer (pro μl):

Phase	rAAV2wt	rAAV2V1	rAAV2K237	rAAV2VBR
15%	$2,5 * 10^6$	$5,6 * 10^5$	$3,8 * 10^5$	$9,7 * 10^5$
25%	$8,5 * 10^6$	$3,2 * 10^6$	$2,4 * 10^6$	$5,1 * 10^6$
40%	$7,2 * 10^7$	$2,7 * 10^6$	$5,5 * 10^5$	$6,0 * 10^5$
60%	$8,4 * 10^4$	$1,3 * 10^4$	$1,6 * 10^3$	$1,3 * 10^3$

Tabelle 7: Titer der rAAV-Konstrukte in allen Ultrazentrifugations-Gradientenphasen (in Kopien/ μl). Bestimmung durch Realtime-PCR auf EGFP nach Isolierung der DNA mit Hilfe des *DNEasy*-Kits.

Wie in der graphischen Auswertung zu erkennen, fand sich bei den Mutanten die größte Konzentration an viraler DNA in der 25%-Bande, und nicht, wie beim Wildtyp, in der 40%-Phase.

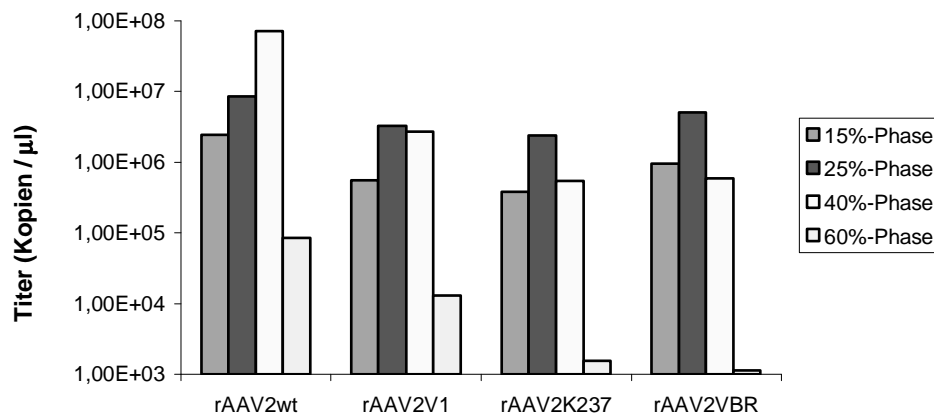


Abbildung 7: Logarithmische Darstellung der Titer der Mutanten in allen UZ-Gradientenphasen. Graphische Darstellung der in Tabelle 7 gelisteten Messwerte.

Eine weitere graphische Auswertung zeigt eindrucksvoll, dass die Mutanten mit zunehmender Größe der Insertion in der 25%-Phase akkumulieren:

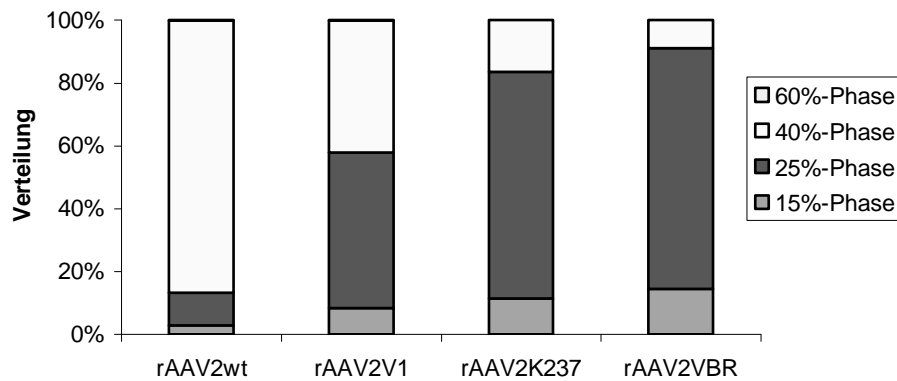


Abbildung 8: Verteilung der Mutanten in den Phasen des Iodixanol-Gradienten bei der Ultrazentrifugation in prozentualer Darstellung.

Um zu klären, ob sich die detektierte DNA in Viruspartikeln oder frei im Medium befindet, wurde eine Benzonase-Spaltung durchgeführt:

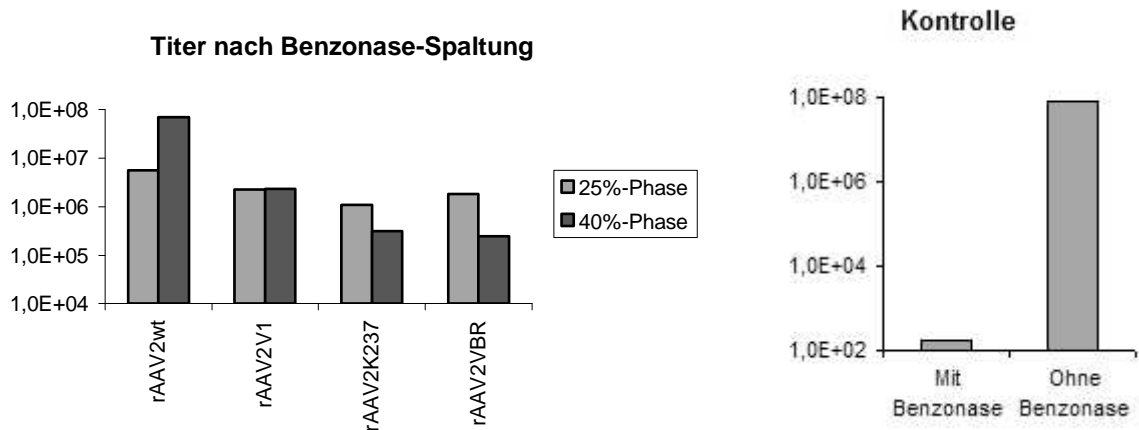


Abbildung 9: Benzonase-Spaltung der Virusstocks. Die Virusstocks wurden vor der DNA-Isolation mit Benzonase behandelt. Als Kontrolle wurde das Plasmid pwtEGFP (10^7 Kopien/ μ l) in 40% Iodixanol aufgenommen und analog behandelt, mit und ohne Benzonase-Spaltung. Anschließend erfolgte eine DNA-Isolation mit *DNeasy* und eine Analyse durch Realtime-PCR auf EGFP.

Während sich das Kontrollplasmid durch Benzonase degradieren ließ, war die DNA in den 25%- und 40%-Phasen der Viruspräparationen weitgehend unverändert zu messen. Es handelt

sich bei der in DotBlot und PCR gemessenen DNA also mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit wirklich um in virale Kapside eingeschlossene Nukleinsäure.

3.6 Etablierung einer quantitativen PCR im Cap-Gen

Im Rahmen der Arbeiten mit dem Lightcycler wurde ein Protokoll für die Quantifizierung von AAV2-Mutanten, die für das Kapsidgen cap kodieren, entwickelt, insbesondere zur Messung des genomischen Titters von wt-Konstrukten und zum Verfolgen von Selektionen mit dem in der Arbeitsgruppe entwickelten AAV2-Display.

Für das Protokoll waren insbesondere die am besten geeignete MgCl-Konzentration und die optimale Hybridisierungstemperatur zu ermitteln. Letztere wurde aufgrund von Vorerfahrungen mit klassischer PCR bei 60°C angesetzt, was sich als sehr geeignet herausstellte. Unter den getesteten MgCl-Konzentrationen (3 mM, 4 mM, 5 mM) erwies sich 5 mM als optimal.

Die ermittelten Parameter und das entwickelte Protokoll für die PCR sind dem Kapitel 2.3.14 zu entnehmen. Die so erstellte Standardkurve zeigt folgendes Diagramm:

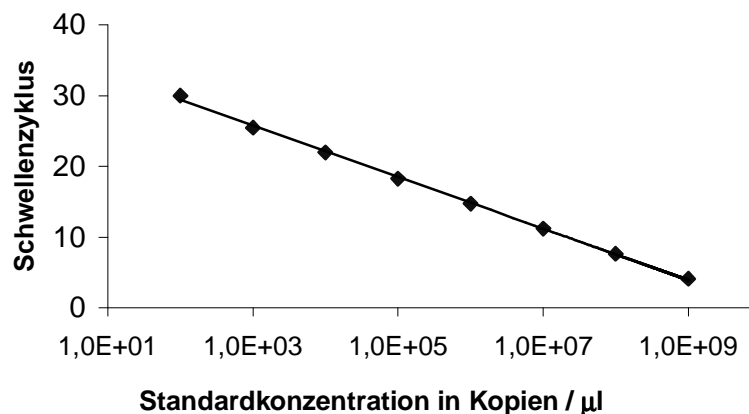


Abbildung 10: Standardkurve der Cap-PCR. Messung verschiedener bekannter DNA-Titer durch quantitative PCR mit den Primern 3021-back und 4066-back. Zehnerlogarithmische Darstellung der Standardkonzentrationen in Kopien/µl auf der x-Achse.

Die Amplifikationseffizienz berechnet sich zu 1,88, der Standardfehler der Regression von y auf x beträgt 0,08. Die Realtime-PCR liefert also mit den ermittelten Parametern sehr gute Ergebnisse.

3.7 Analyse der KDR-Expression auf PAE und PAE-KDR

Zur Charakterisierung der entwickelten Viruskonstrukte wurde unter anderem ein von Dr. Waltenberger entwickeltes System verwendet. Ihm gelang es, Schweineaortenendothelzellen (porcine aorta endothelial cells, PAE) stabil mit einem KDR-kodierenden Plasmid zu transfizieren (Waltenberger et al. 1994). Die so generierten PAE-KDR-Zellen zeigen daher im Gegensatz zu den ursprünglichen PAE-Zellen eine starke KDR-Expression.

Diese Überexpression wurde mittels Oberflächenmarkierung mit einem KDR-spezifischen Antikörper und anschließender FACS-Analyse überprüft:

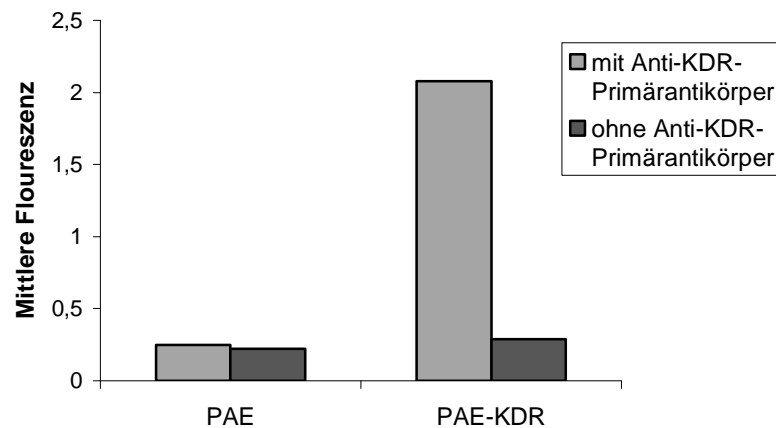


Abbildung 11: Immunologische Messung von KDR auf PAE und PAE-KDR. Die Zellen wurden in Suspension mit einem e-tag markierten Anti-KDR-Antikörper hybridisiert. Nach Inkubation mit einem murinen Anti-E-Tag-Zweitantikörper und einem FITC-markierten Anti-Maus-Drittantikörper wurde die mittlere Fluoreszenz der Zellen durchflusszytometrisch erfasst.

Die fehlende Expression von KDR auf PAE-Zellen und die Überexpression auf PAE-KDR-Zellen ließ sich verifizieren.

3.8 Charakterisierung der Mutanten

3.8.1 Infektiosität der Mutanten auf HeLa

Als erstes Maß für die allgemeine Transduktionseffizienz der Mutanten wurden HeLa-Zellen infiziert. HeLa-Zellen sind Zervixkarzinomzellen. Sie sind durch zahlreiche AAV-Konstrukte und andere Viren sehr gut infizierbar.

Die Infektion erfolgte mit 10^5 genomischen Partikeln pro Zelle. Nach 2 Tagen wurden die Zellen trypsiniert und gewaschen. Anschließend wurde die GFP-Expression der Zellen mit Hilfe der FACS-Analyse ermittelt. Der besseren Lesbarkeit halber werden die mit pRC, prcV1, prcK237 und prcVBR erzeugten rAAV2 im folgenden nur noch mit „wt“, „V1“, „K237“ und „VBR“ bezeichnet.

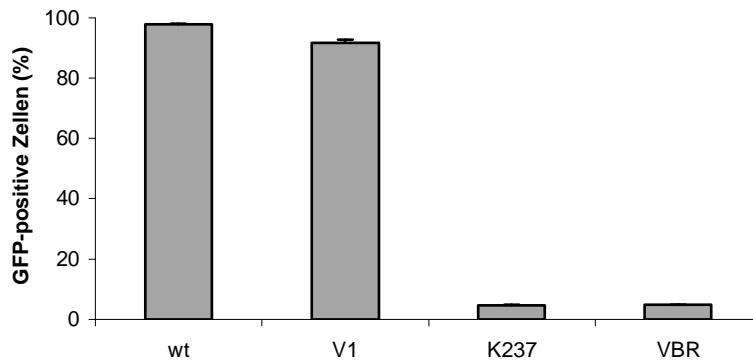


Abbildung 12: Transduktionseffizienz der Mutanten auf HeLa. Die Zellen wurden mit 10^5 genomischen Partikeln pro Zelle von V1, K237 und VBR sowie wt infiziert und nach 2 Tagen im FACS gemessen.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, infiziert die V1-Mutante HeLa-Zellen nur geringfügig schlechter als das Wildtyp-Konstrukt, während die Infektiosität der K237- und VBR-Mutante stark beeinträchtigt ist.

3.8.2 Infektiosität der Mutanten auf PAE und PAE-KDR

Mit den Konstrukten wurden nun PAE- und PAE-KDR-Zellen transfiziert. Die FACS-Analyse ergab folgende Werte:

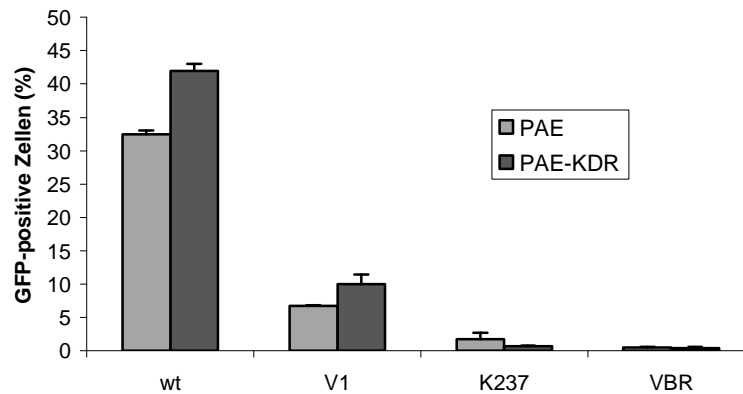


Abbildung 13: Transduktionseffizienz der Mutanten auf PAE und PAE-KDR. PAE bzw. PAE-KDR wurden mit 10^4 genomischen Partikeln pro Zelle infiziert und nach 2 Tagen im FACS gemessen.

Der überraschende Befund dieser Messung ist, dass nach Infektion mit gleichen Mengen Wildtyp-AAV2 die Expression von GFP in PAE-KDR höher ist als in PAE.

3.8.3 rAAV2wt auf PAE und PAE-KDR: FACS-Analyse

Um dieses Ergebnis nachzuprüfen, wurde die Messung mit verschiedenen AAV2-Titern wiederholt, nämlich 10^3 , 10^4 und 10^5 genomischen Partikeln pro Zelle:

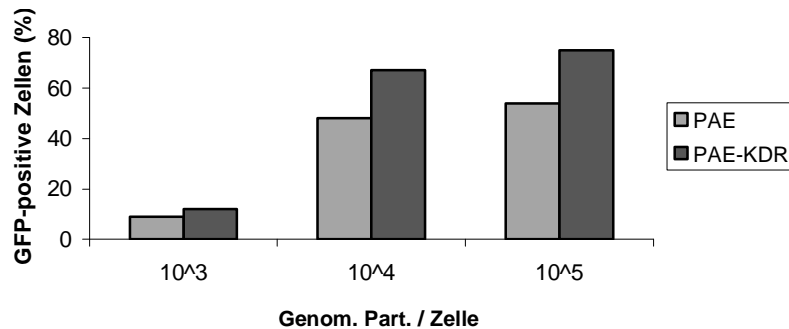


Abbildung 14: Transduktionseffizienz von Wildtyp-AAV2 auf PAE und PAE-KDR. PAE bzw. PAE-KDR wurden mit 10^3 , 10^4 oder 10^5 genomischen Partikeln pro Zelle infiziert und nach 2 Tagen im FACS gemessen.

Wie unschwer zu erkennen, ist die GFP-Expression in PAE-KDR-Zellen höher als in PAE-Zellen – unabhängig von der Menge der Viruspartikel. Der Unterschied der Expressionsraten zwischen PAE-KDR und PAE betrug im Mittel 37% bei einer Standardabweichung von 0,03.

3.8.4 rAAVwt auf PAE und PAE-KDR: genomische Messung

Um zu überprüfen, ob die unterschiedliche GFP-Expression in PAE und PAE-KDR nach wt-Infektion durch eine unterschiedliche Infektiosität der Viren oder durch Unterschiede auf Genexpressionsebene zu Stande kommt, wurde der genomische Titer der rAAV2-Partikel im Zelllysate gemessen. Die Zellen wurden dabei vor der Lyse mehrmals mit PBS gewaschen, daher werden nur intrazelluläre und zellassoziierte rAAV2 erfasst.

Der Anschaulichkeit halber werden in der folgenden Abbildung relative Titer dargestellt, der Wert der mit 10^3 genomischen Partikeln / Zelle infizierten PAE wurde dabei auf 10 gesetzt:

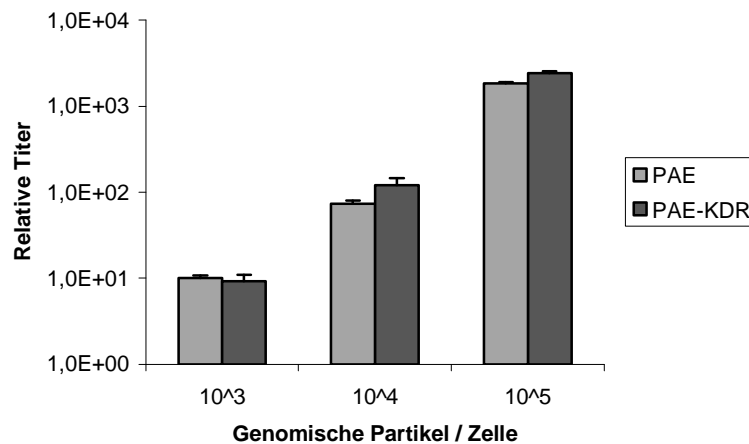


Abbildung 15: Genomische Messung von wt auf PAE und PAE-KDR. PAE- bzw. PAE-KDR-Zellen wurden mit 10^3 , 10^4 oder 10^5 genomischen Partikeln pro Zelle infiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die DNA isoliert und eine Realtime-PCR auf EGFP durchgeführt.

Es zeigte sich eine durchschnittliche Zunahme der Titer auf PAE-KDR versus PAE von 29%, die allerdings wegen der starken Streuung der Quotienten nicht statistisch signifikant ist. Weitere Messungen bestätigten jedoch den Unterschied im Bereich von ca. 30%. Die unterschiedliche GFP-Expression in PAE und PAE-KDR scheint also tatsächlich auf einer unterschiedlichen Transfektionseffizienz der Viren zu beruhen, und kein Artefakt stärkerer Transkription oder Translation zu sein.

3.8.5 rAAVwt und V1 auf HUVEC

Als Modell für primäre endotheliale Zellen wurden menschlichen Endothelzellen aus der Umbilikalvene (human umbilical vein endothelial cells HUVEC) verwendet. Sie exprimieren KDR und sind ein oft genutztes Modell für menschliches Endothel (Waltenberger et al. 1994; Kroll et al. 1999; Nicklin et al. 2001; Zeng et al. 2001).

Die Transduktion dieser Zellen mit wt und V1-Mutante ergab folgendes Ergebnis:

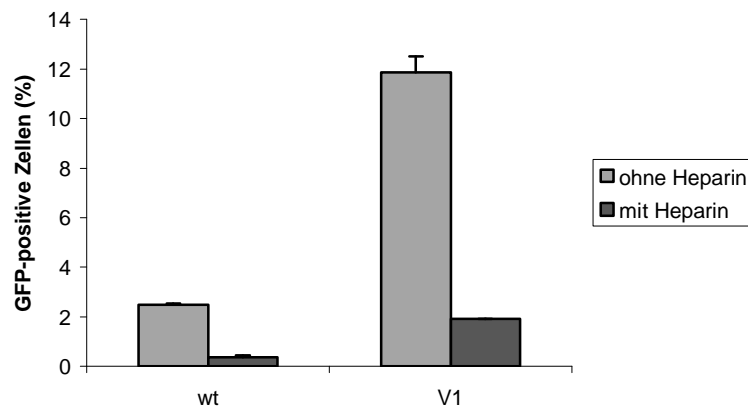


Abbildung 16: Transduktionseffizienz von wt und V1 auf HUVEC. HUVEC wurden mit 10^4 genomischen Partikeln pro Zelle wt und V1 infiziert, jeweils mit und ohne Anwesenheit von 425 IE Heparin pro ml Medium. Nach 2 Tagen wurden die GFP-Expression im FACS bestimmt.

Die V1-Mutante infiziert also HUVEC etwa 5fach besser als das Wildtyp-Konstrukt. Der Abbildung ist ferner zu entnehmen, dass auch die V1-Mutante einen zumindest teilweise HSPG-abhängigen Infektionsmodus aufweist, eine vollständige Inhibition der Infektion durch Heparin gelingt allerdings nicht.

3.8.6 rAAVwt und V1 auf HFF

Als Modell für eine primäre Nichtzielzelle wurden menschliche Vorhautfibroblasten (human foreskin fibroblasts HFF) mit rAAV2wt und der V1-Mutante transduziert. Fibroblasten exprimieren kein KDR (Patterson et al. 1995). Das Ergebnis der FACS-Messung zeigt die folgende Abbildung:

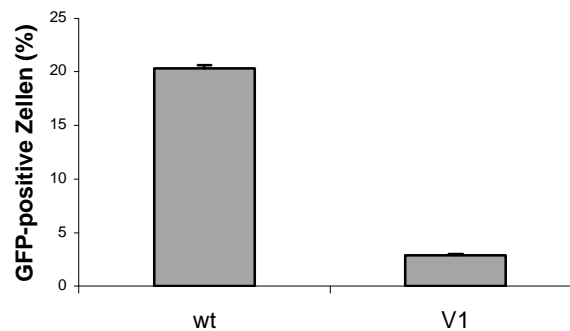


Abbildung 17: wt und V1 auf HFF. HFF wurden mit 10^4 genomischen Partikeln pro Zelle wt bzw. V1 infiziert und nach 2 Tagen im FACS gemessen.

Die V1-Mutante infiziert HFF also wesentlich schlechter als der Wildtyp.

Als Maß für die Zielzellspezifität kann der Quotient der Transduktionseffizienz der Viren auf HUVEC und HFF berechnet werden:

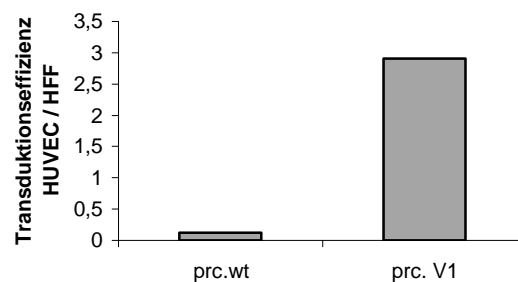


Abbildung 18: Verhältnis der Transduktionseffizienz von wt und V1 auf HUVEC zu HFF. Quotient der im FACS gemessenen GFP-Expressionsraten in HUVEC und HFF nach wt- bzw. V1-Transduktion.

Die so abgeschätzte Zielzellspezifität ist bei V1 etwa 23fach besser als beim Wildtyp.

4 Diskussion

Die Hemmung der Angiogenese ist ein vielversprechender Weg zur Therapie von soliden Neoplasien, da alle soliden Tumore von einer Blutversorgung abhängig sind und Gefäßneubildung induzieren (Gimbrone et al. 1972). Angiogene Gefäße unterscheiden sich von nicht-angiogenen Gefäßen unter anderem im Profil der exprimierten Oberflächenrezeptoren, was sich für gezielte therapeutische Angriffe nutzen lässt. Eine sehr aussichtsreiche Zielstruktur ist KDR, ein Rezeptor für VEGF. KDR ist der zentrale Vermittler der angiogenen Aktivität von VEGF und wird auf angiogenen Endothelzellen stark hochreguliert (Plate et al. 1993; Millauer et al. 1996; Kremer et al. 1997).

KDR eignet sich nicht nur für pharmakologische und immunologische Ansätze, sondern grundsätzlich auch als Rezeptor für virale Genvektoren, wie für das Asian Leukosis Virus (ALV) gezeigt werden konnte (Snitkovsky et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Peptide, die eine Affinität für KDR haben (V1 und K237) oder erwarten lassen (VBR), in das Kapsid des AAV2 an Position I-587 inseriert und die erhaltenen Mutanten analysiert.

4.1 Klonierung der Plasmide

Die für die Virusproduktion benötigten Plasmide ließen sich problemlos klonieren. Die Korrektheit der Sequenzen wurde durch Restriktionsanalysen und Sequenzierungen bestätigt.

4.2 Virusproduktion

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Insertionen beeinträchtigten die Produktionseffizienz der Viren in erheblichem Maße. Bereits die mit insgesamt 12 Aminosäuren relativ kurze V1-Sequenz führt zu Titern, die im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 10-15 niedriger liegen. Dies überrascht ein wenig, beobachtete Anne Girod bei der Insertion des 14 Aminosäuren langen L14-Liganden an derselben Position nur eine relativ geringe Beeinträchtigung, mit im Vergleich zum Wildtyp etwa 50% niedrigeren Titern (Girod et al. 1999). Als Erklärung für die starke Beeinträchtigung der Produktionseffizienz mag die Sequenz des V1-Epitops herangezogen werden: ATWLPPR. Es finden sich also 2 Proline hintereinander, eine sterisch sehr ungünstige Konstellation.

Die Titer der K237- und VBR-Mutante sind in der 40%-Phase noch wesentlich stärker beeinträchtigt. In der Realtime-PCR fanden sich für das rekombinante K237- und VBR-Konstrukt Titer, die im Vergleich zu dem rAAV2 mit Wildtyp-Kapsid um etwa zwei Zehnerpotenzen niedriger lagen.

Es ergaben sich allerdings starke Hinweise darauf, dass die relativ großen Konstrukte K237 und VBR gar nicht bevorzugt in dieser Phase akkumulieren, sondern zu einem wesentlich größeren Teil in der 25%-Phase zu finden sind. Dort ließen sich in der quantitativen PCR deutlich höhere Titer als in der 40%-Phase messen. Um auszuschließen, dass es sich dabei um ein Artefakt freier DNA handelt, wurde eine Spaltung mit Benzonase, einer Endonuklease, durchgeführt. Nach der Spaltung waren die Titer weitgehend unverändert nachzuweisen, es handelt sich also mit hoher Wahrscheinlichkeit um Viruspartikel.

Bezieht man nun die in der 25%-Phase gemessenen Titer in die Abschätzung mit ein, liegt der Unterschied zum Wildtyp nur noch bei rund einer Zehnerpotenz. Es scheinen also AAV2-Partikel mit größeren Insertionen an Position I-587 in zunehmendem Maße in der 25%-Phase des Iodixanol-Gradienten zu akkumulieren. Es mag daher an dieser Stelle spekuliert werden, ob nicht auch Ried et al. (Ried et al. 2002) die Mutanten mit der 34 Aminosäuren langen Z34-Domäne in dieser Fraktion mit höheren Titern hätten messen können.

Eine weitere Erklärung für die starke Beeinträchtigung der Virusproduktion mag in der Ladung der inserierten Epitope zu finden sein. K237 ist mit vier Histidyl- und einem Arginylrest stark positiv geladen, VBR beinhaltet immerhin vier basische Reste (zwei Histidyl- und jeweils ein Arginyl- und Lysylrest) und nur eine sauer agierende Gruppe (Glutamylrest), und ist daher ebenfalls, wenn auch etwas geringer als K237, positiv geladen. In unserer Arbeitsgruppe ließen sich zwei anderen AAV2-Konstrukte mit stark positiv geladenen Insertionen (GRKK bzw. KKQR) nicht in signifikanten Titern produzieren, die Ladung scheint das Kapsid also stark zu destabilisieren. Ähnliches berichten auch Douar et al.. Sie inserierten die stark basischen Sequenzen PKKKRKV (ein nukleäres Lokalisationssignal, NLS) und PKTKRKV (als Kontrolle, „mut-NLS“) an Position I-587, und stellten dabei eine deutlich eingeschränkte Produzierbarkeit der Mutanten fest (Douar et al. 2003).

4.3 Infektionsverhalten der Mutanten

Nachdem gezeigt worden war, dass sich Viren produzieren lassen, wurde das Infektionsverhalten der Mutanten untersucht.

4.3.1 Transduktion von HeLa-Zellen

Als allgemeiner Anhalt für das Transduktionsverhalten der produzierten Konstrukte wurden HeLa-Zellen transduziert und nach 2 Tagen durchflusszytometrisch analysiert. HeLa-Zellen sind Zervixkarzinomzellen, die sich durch viele AAV-Konstrukte gut transduzieren lassen und daher oft als System zur Abschätzung der allgemeinen Infektiosität von AAV2-Mutanten eingesetzt werden (Girod et al. 1999; Shi et al. 2001).

Bei der FACS-Analyse zeigte sich, dass die V1-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp nur gering eingeschränkte Transduktionseffizienz aufweist (92% vs. 98%). Das K237- und das VBR-Konstrukt zeigten hingegen nur eine äußerst geringe Transgen-Expression (5%). Ähnliches berichten auch Douar et al. Ihre Konstrukte, die die NLS- oder mut-NLS-Sequenz an Position I-587 enthielten, waren auf HeLa um zwei bis drei Zehnerpotenzen geringer infektiös als der Wildtyp. Auch Shi et al. berichten, dass Insertionen an der Position I-587 zu Mutanten führen können, die praktisch nicht mehr infektiös sind (Shi et al. 2001). Als mögliche Ursache dürfte vor allem die fehlende Affinität der Virionen zu dem wildtypischen Primärrezeptor HSPG und / oder den Sekundärrezeptoren in Frage kommen. Dies verhindert die zelluläre Aufnahme von AAV2, sofern keine neue (möglicherweise HSPG-unabhängige) Rezeptorinteraktion wie beispielsweise durch den L14-Liganden oder ein RGD-Motiv eingeführt wurde (Girod et al. 1999; Shi et al. 2003).

4.3.2 Transduktion von PAE und PAE-KDR-Zellen

Um Hinweise auf einen möglichen Tropismus der Konstrukte für KDR zu erhalten, wurden PAE- und PAE-KDR transfiziert. PAE sind Schweineaortenendothelzellen, die kein KDR exprimieren, während PAE-KDR mit einem KDR-kodierenden Plasmid transfiziert wurden und KDR stabil überexprimieren (Waltenberger et al. 1996).

In diesem System zeigte das V1-Konstrukt eine gegenüber dem Wildtyp deutlich eingeschränkte Transduktionseffizienz, K237 und VBR führten wiederum zu kaum messbarer Genexpression.

Überraschenderweise zeigte sich bei dem Vergleich PAE- zu PAE-KDR-Zellen, dass bereits der Wildtyp auf PAE-KDR-Zellen eine signifikant höhere Genexpression erzeugt als auf PAE-Zellen. Dieser Befund ließ sich in wiederholten Messungen mit verschiedenen Virusmengen reproduzieren.

Um auszuschließen, dass es sich bei diesem Befund um ein Artefakt höherer Genexpression bei vergleichbarer Transduktionseffizienz handelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll für die quantitative PCR-Analysen transduzierter Zellen entwickelt. Mit diesem Protokoll wird die virale DNA gemessen, während mRNA bei der Präparation durch eine RNase gespalten wird. Das Verfahren ist daher im Gegensatz zur FACS-Analyse nicht von der Genexpression abhängig. Messungen, die mit dieser Methode durchgeführt wurden, sind mittlerweile publiziert (Theiss et al. 2003).

Die quantitative PCR-Analyse von mit Wildtyp transfizierten PAE- und PAE-KDR-Zellen zeigte eine ähnliche Differenz zwischen PAE und PAE-KDR wie die durchflusszytometrische Messung. Der Unterschied lag im Mittel bei 30% zugunsten der PAE-KDR-Zellen. Der in der FACS-Analyse gemessene Unterschied ist also kein Effekt verschiedener Genexpressionsaktivität, sondern rAAV2 hat auf PAE-KDR-Zellen eine höhere Transduktionseffizienz als auf PAE.

Es mag an dieser Stelle spekuliert werden, ob mit KDR ein neuer Sekundärrezeptor für AAV2 gefunden worden ist. Dies wäre insofern plausibel, als KDR eng verwandt ist mit den Tyrosinkinaserzeptoren FGFR1 und HGFR, die als Sekundärrezeptoren für AAV2 beschrieben sind (Qing et al. 1999; Kashiwakura et al. 2005). Um diese Frage zu klären, wären Kompetitionsversuche, in denen KDR spezifisch blockiert wird, ein probater Weg. Allerdings könnten auch andere Effekte, wie eine Hochregulation von HSPG oder den bereits bekannten Sekundärrezeptoren von AAV2 durch die Expression von KDR den Befund erklären. KDR, FGFR1, HGFR und verschiedene Integrine (u.a. $\alpha_v\beta_5$) sind an der Regulation von Angiogenese beteiligt und aktivieren sich überschneidende Signalkaskaden (Munoz-Chapuli et al. 2004), eine gegenseitige Beeinflussung ist also nicht unwahrscheinlich.

Insgesamt zeigte sich das PAE-KDR-System als nicht geeignet zur Analyse des Tropismus der konstruierten Mutanten, da das Verhalten des Wildtyps im Rahmen dieser Arbeit nicht zu erklären war und sich daher auch keine validen Aussagen über den Tropismus der Mutanten treffen ließen.

4.3.3 Transduktion von HUVEC

Die V1-Mutante wurde deshalb auf einem anderen Modellsystem für angiogenes Endothel getestet, auf HUVEC. Dabei handelt es sich um menschliche Nabelschnurvenen-Endothelzellen, also um primäre, humane Zellen. Sie werden von vielen Arbeitsgruppen als Modell für angiogenes Endothel verwendet und exprimieren KDR (Waltenberger et al. 1994; Kroll et al. 1999; Nicklin et al. 2001; Zeng et al. 2001).

Auf HUVEC zeigt die V1-Mutante eine deutlich höhere Genexpression als der Wildtyp. Die Transgenexpression ist ungefähr um den Faktor 5 stärker, das entspricht in etwa dem Faktor, den Nicklin et. al durch Inkorporation des SIGYPLP-Peptides erreicht haben (Nicklin et al. 2000).

In dem HUVEC-System wurde auch die Heparinabhängigkeit der V1-Mutante untersucht. Wildtyp AAV2 infiziert Zellen nach Bindung an Heparansulfatproteoglykan (HSPG) (Summerford et al. 1998). Diese Wechselwirkung lässt sich durch Heparin inhibieren. Einige Kapsidmutanten mit Insertionen im Bereich der Position I-587 besitzen jedoch einen HSPG-unabhängigen Infektionsmechanismus (Girod et al. 1999; Nicklin et al. 2001). Dies dürfte sich durch die Tatsache erklären, dass die um die Position I-587 gelegenen Arginine R-585 und R-588 wesentliche Bestandteile eines Heparin-Bindungsmotivs sind, wie Opie et al. durch Mutationsexperimente zeigten und Kern et al. kurz darauf auch strukturell erklären konnten (Kern et al. 2003; Opie et al. 2004). Durch eine Insertion an Position I-587 wird dieses Heparinbindungsmotiv oft zerstört.

Die Tatsache, dass die V1-Mutante einen zumindest größtenteils Heparin-abhängigen Infektionsmodus aufweist, mag also zunächst überraschen. Betrachtet man sich jedoch die Sequenz des V1-Epitops, ATWLPPR, so liegt am N-Terminus ein Arginin. Da die V1-

Sequenz N-terminal mit einer kurzen Linker-Sequenz, nämlich zwei Alaninen, in das Kapsid eingeführt wurde, findet sich das Arginin der V1-Sequenz genau zwei Aminosäuren carboxyterminal von R-588, an der Stelle von R-585 im Wildtyp-Kapsid. Diese Überlegung könnte die erhaltene Heparinabhängigkeit der V1-Mutante erklären.

4.3.4 Transduktion von HFF

Als primäre Nicht-Zielzellen wurden HFF infiziert. HFF sind primäre menschliche Vorhautfibroblasten, also nichtendotheliale Zellen. Fibroblasten exprimieren kein KDR (Patterson et al. 1995).

In diesem System infiziert die V1-Mutante etwa 5fach schlechter als der Wildtyp, es liegt also ein deutliches Detargeting vor. Die Mutante ist damit der SIG-Mutante von Nicklin et al. vergleichbar. Die Autoren berichten eine auf primären nichtendothelialen Zellen (primären glatten Muskelzellen) um den Faktor 2-3 schlechtere Transduktionseffizienz (Nicklin et al. 2000).

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die V1-Mutante zeigte einen im Vergleich zum Wildtyp deutlich verbesserten Tropismus für HUVEC. Weitere Experimente werden zeigen müssen, ob dieser Tropismus wirklich KDR-vermittelt ist und ob sich die Mutante auch in vivo bewährt.

Die K237- und VBR-Mutante zeigten die Probleme des gewählten Ansatzes auf, kontextfremde Peptide in das AAV-Kapsid zu inkorporieren. Die Auswirkungen auf die Kapsidstabilität und das Infektionsverhalten sind nicht vorherzusagen. Eine vielversprechende Alternative ist daher die Selektion geeigneter Peptide direkt im Kapsidkontext. Dies ermöglicht das in unserer Arbeitsgruppe und davon unabhängig auch durch Müller et al. entwickelte AAV2-Display (Müller et al. 2003; Perabo et al. 2003). Durch geeignete Selektionsalgorithmen werden sich mit diesem Ansatz in Zukunft wahrscheinlich optimierte Mutanten entwickeln lassen.

5 Referenzen

- Ardehali, A., Fyfe, A., Laks, H., Drinkwater, D. C., Jr., Qiao, J. H. and Lusic, A. J. (1995). "Direct gene transfer into donor hearts at the time of harvest." *J Thorac Cardiovasc Surg* **109**(4): 716-9; discussion 719-20.
- Atchison, R. W., Casto, B. C. and Hammon, W. M. (1965). "Adenovirus-Associated Defective Virus Particles." *Science* **149**: 754-55.
- Backer, M. V., Budker, V. G. and Backer, J. M. (2001). "Shiga-like toxin-VEGF fusion proteins are selectively cytotoxic to endothelial cells overexpressing VEGFR-2." *J Control Release* **74**(1-3): 349-55.
- Bartlett, J. S., Wilcher, R. and Samulski, R. J. (2000). "Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors." *J Virol* **74**(6): 2777-85.
- Binetruy-Tournaire, R., Demangel, C., Malavaud, B., Vassy, R., Rouyre, S., Kraemer, M., Plouet, J., Derbin, C., Perret, G. and Mazie, J. C. (2000). "Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis." *Embo J* **19**(7): 1525-33.
- Bleziener, P., Yin, G., Xie, L., Wang, J., Matar, M., Bishop, J. S. and Min, W. (1999). "Intravenous delivery of an endostatin gene complexed in cationic lipid inhibits systemic angiogenesis and tumor growth in murine models." *Angiogenesis* **3**(3): 205-10.
- Böldicke, T., Tesar, M., Griesel, C., Rohde, M., Grone, H. J., Waltenberger, J., Kollet, O., Lapidot, T., Yayon, A. and Weich, H. (2001). "Anti-VEGFR-2 scFvs for cell isolation. Single-chain antibodies recognizing the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/flk-1) on the surface of primary endothelial cells and preselected CD34+ cells from cord blood." *Stem Cells* **19**(1): 24-36.
- Brockstedt, D. G., Podsakoff, G. M., Fong, L., Kurtzman, G., Mueller-Ruchholtz, W. and Engleman, E. G. (1999). "Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration." *Clin Immunol* **92**(1): 67-75.
- Budker, V., Zhang, G., Knechtle, S. and Wolff, J. A. (1996). "Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes." *Gene Ther* **3**(7): 593-8.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. and Nagy, A. (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." *Nature* **380**(6573): 435-9.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L. and Fischer, A. (2000). "Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease." *Science* **288**(5466): 669-72.
- de Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. and Williams, L. T. (1992). "The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor." *Science* **255**(5047): 989-91.
- Douar, A. M., Poulard, K. and Danos, O. (2003). "Deleterious effect of peptide insertions in a permissive site of the AAV2 capsid." *Virology* **309**(2): 203-8.
- Douar, A. M., Poulard, K., Stockholm, D. and Danos, O. (2001). "Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation." *J Virol* **75**(4): 1824-33.
- Ferrara, N. (2000). "VEGF: an update on biological and therapeutic aspects." *Curr Opin Biotechnol* **11**(6): 617-24.

- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J. and Moore, M. W. (1996). "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene." Nature **380**(6573): 439-42.
- Ferrara, N., Gerber, H. P. and LeCouter, J. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-76.
- Ferrari, F. K., Samulski, T., Shenk, T. and Samulski, R. J. (1996). "Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors." J Virol **70**(5): 3227-34.
- Fisher, K. J., Gao, G. P., Weitzman, M. D., DeMatteo, R., Burda, J. F. and Wilson, J. M. (1996). "Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis." J Virol **70**(1): 520-32.
- Folkman, J. (2001). "Angiogenesis-dependent diseases." Semin Oncol **28**(6): 536-42.
- Fong, G. H., Zhang, L., Bryce, D. M. and Peng, J. (1999). "Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice." Development **126**(13): 3015-25.
- Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T. F., Pelletier, N. and Ferrara, N. (2001). "Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants." J Biol Chem **276**(5): 3222-30.
- Gimbrone, M. A., Jr., Leapman, S. B., Cotran, R. S. and Folkman, J. (1972). "Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization." J Exp Med **136**(2): 261-76.
- Girod, A., Ried, M., Wobus, C., Lahm, H., Leike, K., Kleinschmidt, J., Deleage, G. and Hallek, M. (1999). "Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2." Nat Med **5**(9): 1052-6.
- Grifman, M., Trepel, M., Speece, P., Gilbert, L. B., Arap, W., Pasqualini, R. and Weitzman, M. D. (2001). "Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids." Mol Ther **3**(6): 964-75.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M. and Fischer, A. (2003). "A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." N Engl J Med **348**(3): 255-6.
- Hartikka, J., Bozoukova, V., Jones, D., Mahajan, R., Wloch, M. K., Sawdey, M., Buchner, C., Sukhu, L., Barnhart, K. M., Abai, A. M., Meek, J., Shen, N. and Manthorpe, M. (2000). "Sodium phosphate enhances plasmid DNA expression in vivo." Gene Ther **7**(14): 1171-82.
- Heidenreich, R., Kappel, A. and Breier, G. (2000). "Tumor endothelium-specific transgene expression directed by vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences." Cancer Res **60**(21): 6142-7.
- Herold, G. (2005a). Bronchialkarzinom. Innere Medizin. G. Herold: S. 334.
- Herold, G. (2005b). Kolorektales Karzinom. Innere Medizin. G. Herold: 417.
- Herzog, R. W., Yang, E. Y., Couto, L. B., Hagstrom, J. N., Elwell, D., Fields, P. A., Burton, M., Bellinger, D. A., Read, M. S., Brinkhous, K. M., Podsakoff, G. M., Nichols, T. C., Kurtzman, G. J. and High, K. A. (1999). "Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector." Nat Med **5**(1): 56-63.
- Hetian, L., Ping, A., Shumei, S., Xiaoying, L., Luowen, H., Jian, W., Lin, M., Meisheng, L., Junshan, Y. and Chengchao, S. (2002). "A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and

- metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor." *J Biol Chem* **277**(45): 43137-42.
- Hickman, M. A., Malone, R. W., Lehmann-Bruinsma, K., Sih, T. R., Knoell, D., Szoka, F. C., Walzem, R., Carlson, D. M. and Powell, J. S. (1994). "Gene expression following direct injection of DNA into liver." *Hum Gene Ther* **5**(12): 1477-83.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T. and Shibuya, M. (1998). "Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9349-54.
- Kashiwakura, Y., Tamayose, K., Iwabuchi, K., Hirai, Y., Shimada, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Watanabe, M., Oshimi, K. and Daida, H. (2005). "Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection." *J Virol* **79**(1): 609-14.
- Kawabata, K., Takakura, Y. and Hashida, M. (1995). "The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake." *Pharm Res* **12**(6): 825-30.
- Kern, A., Schmidt, K., Leder, C., Muller, O., Wobus, C., Bettinger, K., Von der Lieth, C., King, J. and Kleinschmidt, J. (2003). "Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids." *J Virol* **77**(20): 11072-81.
- Keyt, B. A., Nguyen, H. V., Berleau, L. T., Duarte, C. M., Park, J., Chen, H. and Ferrara, N. (1996). "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* **271**(10): 5638-46.
- Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S. and Ferrara, N. (1993). "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo." *Nature* **362**(6423): 841-4.
- Koch, A. E. (1998). "Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **41**(6): 951-62.
- Kokudo, N. and Makuuchi, M. (2004). "Current role of portal vein embolization/hepatic artery chemoembolization." *Surg Clin North Am* **84**(2): 643-57.
- Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M. and Berns, K. I. (1990). "Site-specific integration by adeno-associated virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6): 2211-5.
- Kremer, C., Breier, G., Risau, W. and Plate, K. H. (1997). "Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system." *Cancer Res* **57**(17): 3852-9.
- Kroll, J. and Waltenberger, J. (1999). "A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **265**(3): 636-9.
- Kronenberg, S., Kleinschmidt, J. A. and Bottcher, B. (2001). "Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids." *EMBO Rep* **2**(11): 997-1002.
- Kukk, E., Lymboussaki, A., Taira, S., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Joukov, V. and Alitalo, K. (1996). "VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development." *Development* **122**(12): 3829-37.
- Lalani, A. S., Chang, B., Lin, J., Case, S. S., Luan, B., Wu-Prior, W. W., VanRoey, M. and Jooss, K. (2004). "Anti-tumor efficacy of human angiostatin using liver-mediated adeno-associated virus gene therapy." *Mol Ther* **9**(1): 56-66.
- Lehrman, S. (1999). "Virus treatment questioned after gene therapy death." *Nature* **401**(6753): 517-8.

- Li, Y., Wang, M. N., Li, H., King, K. D., Bassi, R., Sun, H., Santiago, A., Hooper, A. T., Bohlen, P. and Hicklin, D. J. (2002). "Active immunization against the vascular endothelial growth factor receptor flk1 inhibits tumor angiogenesis and metastasis." J Exp Med **195**(12): 1575-84.
- Liekens, S., De Clercq, E. and Neyts, J. (2001). "Angiogenesis: regulators and clinical applications." Biochem Pharmacol **61**(3): 253-70.
- Lyttle, D. J., Fraser, K. M., Fleming, S. B., Mercer, A. A. and Robinson, A. J. (1994). "Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus." J Virol **68**(1): 84-92.
- Merdan, T., Kopecek, J. and Kissel, T. (2002). "Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer." Adv Drug Deliv Rev **54**(5): 715-58.
- Millauer, B., Longhi, M. P., Plate, K. H., Shawver, L. K., Risau, W., Ullrich, A. and Strawn, L. M. (1996). "Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo." Cancer Res **56**(7): 1615-20.
- Mizukami, H., Young, N. S. and Brown, K. E. (1996). "Adeno-associated virus type 2 binds to a 150-kilodalton cell membrane glycoprotein." Virology **217**(1): 124-30.
- Müller, O. J., Kaul, F., Weitzman, M. D., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J. A. and Trepel, M. (2003). "Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors." Nat Biotechnol **21**(9): 1040-6.
- Muller, Y. A., Christinger, H. W., Keyt, B. A. and de Vos, A. M. (1997a). "The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding." Structure **5**(10): 1325-38.
- Muller, Y. A., Li, B., Christinger, H. W., Wells, J. A., Cunningham, B. C. and de Vos, A. M. (1997b). "Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7192-7.
- Munoz-Chapuli, R., Quesada, A. R. and Angel Medina, M. (2004). "Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells." Cell Mol Life Sci **61**(17): 2224-43.
- Nakai, H., Storm, T. A. and Kay, M. A. (2000). "Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo." J Virol **74**(20): 9451-63.
- Nicklin, S. A., Buening, H., Dishart, K. L., de Alwis, M., Girod, A., Hacker, U., Thrasher, A. J., Ali, R. R., Hallek, M. and Baker, A. H. (2001). "Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells." Mol Ther **4**(3): 174-81.
- Nicklin, S. A., White, S. J., Watkins, S. J., Hawkins, R. E. and Baker, A. H. (2000). "Selective targeting of gene transfer to vascular endothelial cells by use of peptides isolated by phage display." Circulation **102**(2): 231-7.
- Opie, S., Warrington, K. J., Agbandje-McKenna, M., Zolotukhin, S. and Muzyczka, N. (2004). "Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding." J Virol **77**(12): 6995-7006.
- Park, J. E., Chen, H. H., Winer, J., Houck, K. A. and Ferrara, N. (1994). "Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR." J Biol Chem **269**(41): 25646-54.
- Patterson, C., Perrella, M. A., Hsieh, C. M., Yoshizumi, M., Lee, M. E. and Haber, E. (1995). "Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor." J Biol Chem **270**(39): 23111-8.

- Perabo, L., Buning, H., Kofler, D. M., Ried, M. U., Girod, A., Wendtner, C. M., Enssle, J. and Hallek, M. (2003). "In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display." Mol Ther **8**(1): 151-7.
- Plate, K. H., Breier, G., Millauer, B., Ullrich, A. and Risau, W. (1993). "Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis." Cancer Res **53**(23): 5822-7.
- Plate, K. H., Breier, G., Weich, H. A. and Risau, W. (1992). "Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo." Nature **359**(6398): 845-8.
- Posey, J. A., Ng, T. C., Yang, B., Khazaeli, M. B., Carpenter, M. D., Fox, F., Needle, M., Waksal, H. and LoBuglio, A. F. (2003). "A phase I study of anti-kinase insert domain-containing receptor antibody, IMC-1C11, in patients with liver metastases from colorectal carcinoma." Clin Cancer Res **9**(4): 1323-32.
- Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V. and Srivastava, A. (1999). "Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2." Nat Med **5**(1): 71-7.
- Reich, S. J., Fosnot, J., Kuroki, A., Tang, W., Yang, X., Maguire, A. M., Bennett, J. and Tolentino, M. J. (2003). "Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model." Mol Vis **9**: 210-6.
- Ried, M. U., Girod, A., Leike, K., Buning, H. and Hallek, M. (2002). "Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors." J Virol **76**(9): 4559-66.
- Russell, D. W., Hirata, R. K. and Inoue, N. (2002). "Validation of AAV-mediated gene targeting." Nat Biotechnol **20**(7): 658.
- Sanlioglu, S., Benson, P. K., Yang, J., Atkinson, E. M., Reynolds, T. and Engelhardt, J. F. (2000). "Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation." J Virol **74**(19): 9184-96.
- Schatzlein, A. G. (2001). "Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress." Anticancer Drugs **12**(4): 275-304.
- Schwartz, B., Benoist, C., Abdallah, B., Rangara, R., Hassan, A., Scherman, D. and Demeneix, B. A. (1996). "Gene transfer by naked DNA into adult mouse brain." Gene Ther **3**(5): 405-11.
- Seisenberger, G., Ried, M. U., Endress, T., Buning, H., Hallek, M. and Brauchle, C. (2001). "Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus." Science **294**(5548): 1929-32.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W. L., Fischer, K. D., Schuh, A. C., Schwartz, L., Bernstein, A. and Rossant, J. (1997). "A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis." Cell **89**(6): 981-90.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. and Schuh, A. C. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." Nature **376**(6535): 62-6.
- Shi, W., Arnold, G. S. and Bartlett, J. S. (2001). "Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors." Hum Gene Ther **12**(14): 1697-711.
- Shi, W. and Bartlett, J. S. (2003). "RGD inclusion in VP3 provides adeno-associated virus type 2 (AAV2)-based vectors with a heparan sulfate-independent cell entry mechanism." Mol Ther **7**(4): 515-25.
- Sikes, M. L., O'Malley, B. W., Jr., Finegold, M. J. and Ledley, F. D. (1994). "In vivo gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection." Hum Gene Ther **5**(7): 837-44.

- Snitkovsky, S., Niederman, T. M., Mulligan, R. C. and Young, J. A. (2001). "Targeting avian leukosis virus subgroup A vectors by using a TVA-VEGF bridge protein." J Virol **75**(3): 1571-5.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G. and Klagsbrun, M. (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." Cell **92**(6): 735-45.
- Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G. and Bussolino, F. (1999). "Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2." Embo J **18**(4): 882-92.
- Statistisches_Bundesamt (2004). http://www.destatis.de/themen/d/thm_gesundheit.php.
- Summerford, C., Bartlett, J. S. and Samulski, R. J. (1999). "AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection." Nat Med **5**(1): 78-82.
- Summerford, C. and Samulski, R. J. (1998). "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions." J Virol **72**(2): 1438-45.
- Theiss, H. D., Kofler, D. M., Buning, H., Aldenhoff, A. L., Kaess, B., Decker, T., Baumert, J., Hallek, M. and Wendtner, C. M. (2003). "Enhancement of gene transfer with recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors into primary B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by CpG-oligodeoxynucleotides." Exp Hematol **31**(12): 1223-9.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A. and Kay, M. A. (2003a). "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy." Nat Rev Genet **4**(5): 346-58.
- Thomas, J. P., Arzooanian, R. Z., Alberti, D., Marnocha, R., Lee, F., Friedl, A., Tutsch, K., Dresen, A., Geiger, P., Pluda, J., Fogler, W., Schiller, J. H. and Wilding, G. (2003b). "Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors." J Clin Oncol **21**(2): 223-31.
- Veenendaal, L. M., Jin, H., Ran, S., Cheung, L., Navone, N., Marks, J. W., Waltenberger, J., Thorpe, P. and Rosenblum, M. G. (2002). "In vitro and in vivo studies of a VEGF121/rGelolin chimeric fusion toxin targeting the neovasculature of solid tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 7866-71.
- Verheul, H. M. and Pinedo, H. M. (2003). "Vascular endothelial growth factor and its inhibitors." Drugs Today (Barc) **39 Suppl C**: 81-93.
- Vile, R. G. and Hart, I. R. (1993). "In vitro and in vivo targeting of gene expression to melanoma cells." Cancer Res **53**(5): 962-7.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. and Heldin, C. H. (1994). "Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor." J Biol Chem **269**(43): 26988-95.
- Waltenberger, J., Mayr, U., Pentz, S. and Hombach, V. (1996). "Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia." Circulation **94**(7): 1647-54.
- Wells, D. J. (2004). "Gene Therapy Progress and Prospects: Electroporation and other physical methods." Gene Ther.
- Wistuba, A., Weger, S., Kern, A. and Kleinschmidt, J. A. (1995). "Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins." J Virol **69**(9): 5311-9.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P. L. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." Science **247**(4949 Pt 1): 1465-8.
- Xiao, W., Warrington, K. H., Jr., Hearing, P., Hughes, J. and Muzyczka, N. (2002). "Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2." J Virol **76**(22): 11505-17.

- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A. and Chapman, M. S. (2002). "The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10405-10.
- Zeng, H., Sanyal, S. and Mukhopadhyay, D. (2001). "Tyrosine residues 951 and 1059 of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) are essential for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-induced endothelium migration and proliferation, respectively." J Biol Chem **276**(35): 32714-9.
- Zhang, G., Budker, V. and Wolff, J. A. (1999). "High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA." Hum Gene Ther **10**(10): 1735-7.
- Zhang, G., Vargo, D., Budker, V., Armstrong, N., Knechtle, S. and Wolff, J. A. (1997). "Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers." Hum Gene Ther **8**(15): 1763-72.
- Zhu, Z., Lu, D., Kotanides, H., Santiago, A., Jimenez, X., Simcox, T., Hicklin, D. J., Bohlen, P. and Witte, L. (1999). "Inhibition of vascular endothelial growth factor induced mitogenesis of human endothelial cells by a chimeric anti-kinase insert domain-containing receptor antibody." Cancer Lett **136**(2): 203-13.
- Ziegler, B. L., Valtieri, M., Porada, G. A., De Maria, R., Muller, R., Masella, B., Gabbianelli, M., Casella, I., Pelosi, E., Bock, T., Zanjani, E. D. and Peschle, C. (1999). "KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells." Science **285**(5433): 1553-8.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

6.1 Abbildungen

Abbildung 1: Genomstruktur und Genexpression von AAV-2.....	12
Abbildung 2: Restriktionsanalyse der klonierten wt-Konstrukte.....	52
Abbildung 3: Analyse der Verpackungseffizienz der wt-Konstrukte im DotBlot	54
Abbildung 4: Restriktionsanalyse der klonierten pRC-Konstrukte.....	57
Abbildung 5: Analyse der Verpackungseffizienz der pRC-Konstrukte im DotBlot	58
Abbildung 6: Vergleich der durch DotBlot und Realtime-PCR erhaltenen Titer.	60
Abbildung 7: Logarithmische Darstellung der Titer der Mutanten in allen UZ-Gradientenphasen.....	61
Abbildung 8: Verteilung der Mutanten in den Phasen in prozentualer Darstellung.....	62
Abbildung 9: Benzonase-Spaltung der Virusstocks.....	62
Abbildung 10: Standardkurve der Cap-PCR.	63
Abbildung 11: Immunologische Messung von KDR auf PAE und PAE-KDR.....	64
Abbildung 12: Transduktionseffizienz der Mutanten auf HeLa	65
Abbildung 13: Transduktionseffizienz der Mutanten auf PAE und PAE-KDR.....	66
Abbildung 14: Transduktionseffizienz von Wildtyp-AAV2 auf PAE und PAE-KDR.....	67
Abbildung 15: Genomische Messung von wt auf PAE und PAE-KDR.....	68
Abbildung 16: Transduktionseffizienz von wt und V1 auf HUVEC	69
Abbildung 17: wt und V1 auf HFF	70
Abbildung 18: Verhältnis der Transduktionseffizienz von wt und V1 auf HUVEC zu HFF.....	70

6.2 Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über verschiedene virale Genvektoren (angelehnt an Thomas et al. 2003).....	10
Tabelle 2: Sequenz der Konstrukte im Bereich I-587	29
Tabelle 3: Genomischer Titer der Wildtyp-Konstrukte.....	55
Tabelle 4: Kapsid-Titer der wt-Konstrukte.	56
Tabelle 5: Genomischer Titer der pRC-Konstrukte.	59
Tabelle 6: Genomischer Titer der rAAV-Konstrukte bestimmt durch die Realtime-PCR-Methode.....	59
Tabelle 7: Titer der rAAV-Konstrukte in allen Ultrazentrifugations-Gradientenphasen.	61

7 Lebenslauf

Person

Name: Bernhard Michael Kaess
Adresse: Adalbert-Stifter-Str. 7, 83278 Traunstein
Studienadresse: Connolly-Str. 3 / C108, 80809 München
Geburtsdatum: 03.04.1978
Geburtsort: Traunstein
Eltern: Dr. Wolfgang Kaess, Nervenarzt
Gerda Kaess, Dipl. Math.
Geschwister: ein jüngerer Bruder

Ausbildung

Schulische Bildung:

September 1985 Einschulung in die Grundschule an der Haslacherstraße, Traunstein
September 1989 Wechsel an das Chiemgau Gymnasium Traunstein,
humanistischer Zweig
Mai 1998 Abitur

Studium:

November 1998 Beginn eines Medizinstudiums an der LMU München
August 2000 Ärztliche Vorprüfung
August 2001 1. Staatsexamen
März 2004 2. Staatsexamen
April 2005 3. Staatsexamen

Famulaturen:

Februar 2001	Kardiologie im Kreiskrankenhaus Traunstein
März 2002	Neurologie am MPI für Psychiatrie (München)
September 2002	Ophthalmologie im Hospital Regional Arequipa (Peru)
August 2003	Gastroenterologie und Endokrinologie im Klinikum Großhadern
September 2003	Ophthalmologie am Klinikum Rechts der Isar (München)

Praktisches Jahr:

April / Mai 2004	Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie am Hôpital Lapeyronie der Université de Montpellier
Juni / Juli 2004	Traumatologie und Plastische Chirurgie am Montreal General Hospital der McGill University
Aug. / Sep. 2004	Ophthalmologie in der Augenklinik der LMU München
Dez. 04 – Feb. 2005	Innere Medizin in der Klinik an der Ziemsenstraße der LMU München

Publikationen

Theiss, H. D., Kofler, D. M., Buning, H., Aldenhoff, A. L., Kaess, B., Decker, T., Baumert, J., Hallek, M. and Wendtner, C. M. (2003). "Enhancement of gene transfer with recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors into primary B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by CpG-oligodeoxynucleotides." Exp Hematol **31**(12): 1223-9.

Stipendien

Mai 2000	Aufnahme in die bayrische Begabtenförderung
April 2001	Aufnahme in E-Fellows.net

Beruflicher Werdegang

August 2005 Anstellung als Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik II
des Universitätsklinikums Regensburg

Sprachen

englisch	fließend in Wort und Schrift
spanisch	gute Kenntnisse
französisch	gute Kenntnisse
latein, altgriechisch	fremdwortsicher

8 Danksagung

Ich möchte mich bei folgenden Personen bedanken:

Prof. Michael Hallek, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit verfasst wurde. Vielen Dank für die Schaffung der Rahmenbedingungen, die diese Arbeit ermöglicht haben, und ganz besonders für den persönlichen Rat in auch schwierigen Zeiten.

Dr. Hildegard Büning, die meine Doktorarbeit über große Teile betreut hat und mir bei Problemen stets zur Seite stand.

Dr. Jörg Enssle, der mich bei der Durchführung meiner Experimente und bei technischen Problemen tatkräftig unterstützt hat.

Prof. Dr. Dr. Heesemann, dem Vorsitzenden des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“. Als assoziiertes Mitglied konnte ich an vielen interessanten Seminaren teilnehmen und meinen Horizont erweitern.

Prof. Dr. Grossschedl, der dem Genzentrum von 1999 bis April 2004 vorstand und mir die räumlichen und apparativen Möglichkeiten für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Der Arbeitsgruppe Hallek / Büning, die stets hilfreich war und mir durch ein wunderbares Arbeitsklima vieles erleichtert hat.

Meiner Familie, die mich in jeder Hinsicht unterstützt hat und der ich fast alles verdanke.